

THÈSE

présentée

à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'État)

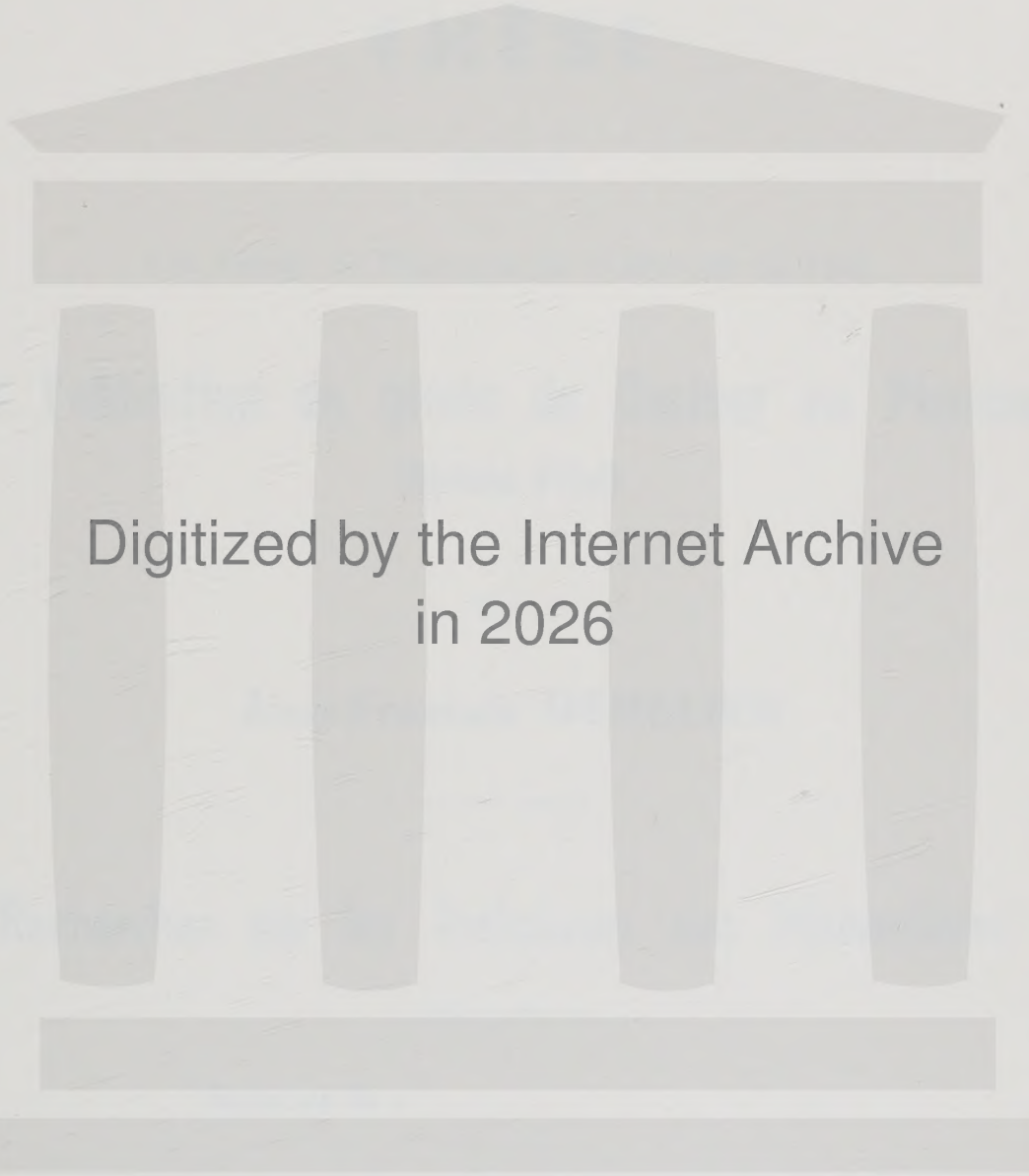
par

Jean-François DEMELIER

Recherches sur les Tréhalases des Mammifères

Soutenue le : 9 MARS 1970

JURY : MM. les Professeurs J. E. COURTOIS, Président
M. L. GIRARD } Examineurs
F. PERCHERON }



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550207_0032

THÈSE

présentée

à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'État)

par

Jean-François DEMELIER

Recherches sur les Tréhalases des Mammifères

Soutenue le :

JURY : MM. les Professeurs J. E. COURTOIS, Président
M. L. GIRARD } Examineurs
F. PERCHERON }

P R O F E S S E U R S

M. JANOT M.M.	O + Membre de l'Institut.....	Pharmacie Galénique (T)
M. VALETTE G.	O +	Pharmacodynamie (T)
M. PARIS R.	O +	Matière Médicale (T)
M. GUILLOT M.	O +	Physique (T)
M. GAUTIER J.A.	O +	Chimie Organique (T)
M ^{le} LAMBIN S.	+	Microbiologie (T)
M. RAOUL Y.	+	Physiologie (T)
M. COURTOIS J.	+	Chimie Biologique (T)
M. DOMANGE L.	O +	Chimie Générale et Minérale (T)
M. TRUHAUT R.	O + Membre de l'Institut.....	Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
M. MORETTE A.	+	Hydrologie (T)
M. CAVIER R.	+	Parasitologie (T)
M. QUEVAUVILLER A.	+	Hygiène et éducation Sanitaire (T)
M. MOREAU R.	+	Pharmacie Chimique (T)
M. GERMAN A.		Microbiologie (T)
M. PIETTE M.	+	Hématologie (T)
M. MALANGEAU P.		Chimie Analytique (T)
M. GIRARD M.	+	Biochimie Appliquée (T)
M. DILLEMAN G.		Législation, Déontologie Histoire de la Pharmacie(T)
M. DEYSSON G.	+	Botanique (T)
M. FLAHAUT J.		Minéralogie (T)
M. RENAULT J.		Chimie Organique (T)
M. LE HIR A.		Pharmacie Galénique (T)
M. BOUDENE C.		Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
M. LARUELLE P.		Physique (T)
M. ROSSIGNOL P.		Pharmacodynamie (T)
M. MANGEOT A.		Pharmacie Galénique Industrielle (T)

M. DELAVEAU P.		Séméiologie et Pathologie générale (T)
M. COHEN Y.		Pharmacodynamie (T)
M. RENAULT H.		Physique
M. BOURDON R.		Chimie Analytique
M. REYNAUD P.		Pharmacie Chimique
M. LE MAON R.		Toxicologie
M. POISSON J.		Pharmacie Galénique
M. MICHEL R.		Endocrinologie (T)
M. LECLERC M.		Hématologie
M. PERCHERON F.		Chimie Biologique
M. SAVEL J.		Biologie Animale
M. DESVIGNES A.		Cryptogamie

M A I T R E S _ D E _ C O N F E R E N C E S

M. PAOLETTI C.		Toxicologie
M. BORY J.		Microbiologie
M. MIOCQUE M.		Chimie Organique
M. GUIGNARD J.L.		Botanique Générale
M. GOUNELLE J.C.		Physiologie
M. BINET P.		Biologie Animale
M. COMBET FARNOUX C.		Chimie Organique
Mme PLAT M.		Législation et Déontologie Pharmaceutique
M. DELACOUX E.		Pharmacie Chimique
M. DUCHON D'ENGENIERES M.		Chimie Organique
M. ADOLPHE C.		Physique
M. GUERNET M.		Chimie Analytique
M. DIDRY J.		Mathématiques appliquées aux Sciences expérimentales
M. KHODADAD P.		Chimie Minérale
M. PUISIEUX F.		Pharmacie Galénique
M. GUERIN H. (Chargé de cours)		Matière Médicale

M. PERLES R. (dél.).....	Chimie Biologique
M. YONGER J. (dél.).....	Chimie Analytique
M. MESTRE J. (dél.).....	Botanique
M. RIVET J. (dél.)	Chimie Générale et Minérale
M. HAZEBROUCQ G. (dél.).....	Physique
M. BOURRINET P. (dél.).....	Hygiène
M. ETIENNE J. (dél.).....	Mathématiques
M. SOULEAU Ch. (dél.).....	Chimie générale et Minérale
M. HAMON M. (dél.)	Chimie Analytique
M. AGNERAY J. (dél.).....	Biologie
M. DREUX C. (dél.)	Biochimie Appliquée
M. ROUSSELET F. (dél.).....	Chimie Analytique

M A I T R E S _ D E _ C O N F E R E N C E S _ H O N O R A I R E S

M. GESTEAU P.	+
M. GUERIN H.	+
Mme HARISPE M.	
Mle LONGUEVALLE S.	

C H E F S _ D E _ T R A V A U X _ P R A T I Q U E S

(Liste alphabétique)

M. ADAM Y.		T.P. Pharmacie Chimique 5ème A.
M. AYMARD P.		E.D. Physiologie
Mle BARNIER S. (dél.).....		Mathématiques
Mle BERNARD J.		Bactériologie 5ème A.
M. BESANCON P. (dél.).....		Mathématiques
Mme BLANC J. (dél.).....		E.D. Chimie Organique 1ère A.
Mme BONALY J. (dél.).....		E.D. Botanique 1ère A.
Mle BOURNIQUE C.		T.P. Physiologie Végétale
M. BRALET M. (dél.).....		E.D. Zoologie 1ère A.

M. CANAL J. (dél.)		Biochimie appliquée 5ème A.
M. CARLIER A.		CES Pharmacie Galénique Industrielle
M. CARRE D. (dél.)		Mathématiques
Mle CARRERE C.		T.P. Microbiologie 4ème A.
Mme CENAC J.		CES Parasitologie
M. CERCEAU H. (dél.)		E.D. Chimie Minérale 1ère A.
Mme CHARPENTIER M.		E.D. Chimie Générale et Minérale
M. CHERON J.M. (dél.)		T.P. Chimie Biologique
Mle CHOIX M.		T.P. Pharmacie Galénique
Mle CLAIR G.		E.D. Essais Médicaments Végétaux
M. DRAGON C.		E.D. Chimie Générale et Minérale
M. DAVY J. (dél.)		CES Biochimie
Mle DECAUDIN M.T.		T.P. Parasitologie 4ème A.
M. DELATTRE J. (dél.)		Biochimie Appliquée 5ème A.
M. DELCOURT A. (dél.)		E.D. Botanique
M. DOUSSIN A.		T.P. Chimie Analytique 5ème A.
Mle DUMANT G.		CES Contrôle Médicaments (Physico-chim.)
Mme DUPONT C.		P.T. Pharmacodynamie
M. ETIENNE G.		T.P. Pharmacie Galénique
Mme FAURE L.		E.D. Chimie Organique
Mle FLEURY S.		E.D. Chimie Analytique Quantitative 2ème A.
Mle FOGLIETTI A.M.		T.P. Chimie Biologique
M. GIRARDEAU F. (dél.)		T.P. Chimie Organique 5ème A.
M. GOBERT J. (dél.)		T.P. Zoologie 1ère A.
Mle GOURSAT M.J.		E.D. Botanique 1ère A.
M. GROSSIORD J.L. (dél.)		T.P. Physique 1ère A.
Mle GUILLOUX E. (dél.)		T.P. Chimie Biologique
M. HARISPE J.	+	T.P. Chimie Organique 2ème A.
M. HENRY J.		Essais médicaments chimiques et galéniques
Mme HUBERT J.		CES Bactériologie, Immunologie
Mme JULIEN M.		E.D. Physique 2ème A.

M. JULIEN R.		E.D. Chimie Générale et Minérale 1ère A.
Mlle JUND Y.		CES Microbiologie, Bactériologie
M. LALLEGERIE P. (dél.)		CES Biochimie
M. LAROCHE J.		Hygiène Education Sanitaire
M. LEBOEUF M.		CES Pharmacotechnie Galénique
Mme LEDUC Y.		Chimie Analytique Qualitative
M. LEGENDRE L. (dél.)		T.P. Chimie Organique 2ème A.
Mme LEGER N.		Parasitologie 5ème A.
M. LELUAN G.		Bactériologie C.E.S.
M. LELUC R.		T.P. Microbiologie 5ème A. et Biologie
M. LEMAY R.		Législation
M. LEMONNIER A.		T.P. Chimie Analytique Quantitative
M. LEPAREUR C. (dél.)		Mathématiques
Mme LEQUANG T. (dél.)		T.P. Chimie Analytique Qualitative
M. LEVILLAIN P.		E.D. Chimie Analytique 1ère A.
Mme LEVY F. (dél.)		E.D. Botanique 2ème A.
M. LIKFORMAN J.		E.D. Physique 1ère A.
Mlle LONGEVIALLE M.		E.D. Botanique 1ère A.
M. MACCARIO J. (dél.)		Mathématiques
M. MAHUZIER G.		T.P. Chimie Analytique Qualitative
M. MANDEREAU J.		CES Pharmacotechnie Chimique
M. MANET L.		Chimie Biologique C.E.S.
M. MARTIN FRERE H.		T.P. Chimie Générale et Minérale 1ère A.
M. MAUGUEN Y. (dél.)		Mathématiques
Mlle MICHELET A.		E.D. Chimie Générale et Minérale 2ème A.
Mlle MORIN H.		CES Pharmacodynamie
Mme MOURY J. (dél.)		T.P. Zoologie 1ère A.
M. N'GUYEN P.L. (dél.)		CES Toxicologie
Mme NOTTEGHEM M.J.		T.P. Parasitologie 4ème A.
Mme PANOUSE J.		Microbiologie et Virologie C.E.S.

Mme PAOLAGGI F.		CES Electrochimie
M. PARIS M.		CES Contrôle médicaments (biologie)
M. PESTIS J.		T.P. Anatomie Physiologie Humaines
Mme PIETTE C.		Hématologie Biologie 5ème A.
M. POUILLAIN P.		CES Hématologie
M. POUSSET J.L.		Chimie Extractive
M. QUENEZ P.		T.P. Chimie Générale et Minérale 1ère A.
Mme ROBERT M.		CES Immunologie Microbiologie
M. RODIER N. (dél.)		E.D. Physique 2ème A.
Mle ROLLEN A.	+	T.P. Botanique 1ère A.
Mle ROUSSELET R.		Essais Médicaments Végétaux
Mme RUDLER M. (dél.)		E.D. Chimie Organique
Mme SALES N.		T.P. Physiologie
M. SCHUSTER J.		Toxicologie 4ème et 5ème A.
Mle SORIA C.		Biochimie Appliquée 5ème A.
Mme SEILLER M.		T.P. Pharmacie Galénique Industrielle
Mle STRUPLER N.		E.D. Chimie Générale et Minérale 1ère A.
M. THUONG CONG TRIEU		T.P. Chimie Analytique Quantitative
Mle TROUPEL S. (dél.)		T.P. Chimie Analytique Quantitative
M. VIERFOND J.M.		T.P. Chimie Organique 5ème A. (synthèse organique)
M. VILLERS J.		T.P. Physique 2ème A.
Mme WELBY J. (dél.)		T.P. Pharmacie Galénique

B I B L I O T H E Q U E

Mle RUYSSSEN Y.	+	Conservateur en Chef
Mme DESGRIPPES A.		Conservateur
Mle BOUVRESSE A.M.		Bibliothécaire
Mme COULET M.A.		Bibliothécaire
Mle LANGLOIS C.		Bibliothécaire

Légion d'honneur	{	+ Chevalier
		O Officier
		C Commandeur

A Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS,
Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Membre de l'Académie Nationale de Médecine,
Chevalier de la Légion d'Honneur,
Inspecteur Général des Pharmacies de l'Assistance Publique,

qui après nous avoir conseillé et guidé tout au
long de ce travail, nous a fait l'honneur de présider
notre jury,

En témoignage de notre profonde gratitude et de
notre respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur M.L. GIRARD,
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Chevalier de la Légion d'Honneur,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

Qui après nous avoir accueilli comme Assistant,
nous a manifesté une constante bienveillance et
nous a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail,

En témoignage de notre respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur F. PERCHERON,
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

Qui a bien voulu accepter de juger ce travail,

En témoignage de notre respectueuse reconnaissance
pour l'intérêt qu'il a manifesté au sujet de nos
recherches.

A ma femme,

A mes deux fils,

A mes parents,

Dont la constante affection m'a encouragé dans la
voie de la recherche.

INTRODUCTION

0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0

En 1962, DEBRIS, COURTOIS et PETEK (32) voulant isoler et purifier l' α galactosidase du rein de Porc, mettent en évidence dans les préparations provenant de cet organe une forte activité tréhalasique. Plus tard, COURTOIS et coll. (16) ont montré l'existence constante d'une tréhalase dans le plasma des Mammifères et en particulier dans celui de l'Homme. Poursuivant les travaux entrepris par GEORGET (36) sur la tréhalase du sérum humain, nous avons été amenés à étudier les organes de l'Homme et de différents Mammifères pour y rechercher une éventuelle activité tréhalasique. Notre premier but était en effet de trouver l'origine de la tréhalase du sérum humain. Ce travail nous a permis de conclure que trois organes seulement possédaient une activité tréhalasique et étaient susceptibles de libérer l'enzyme dans le sang ; ce sont : l'intestin, le rein et le foie. Nous avons alors tenté de prouver en effectuant un certain nombre de déterminations de tréhalase sérique au cours de différents états pathologiques que l'origine intestinale de l'enzyme sérique semblait exclue ; que si une partie de l'enzyme pouvait être d'origine rénale, la totalité de la tréhalase ne provenait pas du rein, mais qu'une partie importante était vraisemblablement synthétisée par le foie. Nous avons enfin montré qu'à côté d'une faible élimination urinaire de l'enzyme déjà mise

en évidence par GEORGET (36) une partie importante de la tréhalase sanguine était éliminée par la bile.

Afin de confirmer l'origine mixte, hépatique et rénale de la tréhalase sérique, nous avons entrepris d'extraire et de purifier les tréhalases humaines de différentes origines pour en étudier les propriétés, et ainsi les comparer à celles de l'enzyme sérique. Notre intérêt s'est surtout porté sur l'enzyme humain mais pour des raisons de facilité, nos essais préliminaires ont été effectués sur des organes de Porc, ce qui nous a amené à comparer les tréhalases de Porc et d'Homme.

Enfin l'étude complète des tréhalases sérique, rénale, intestinale et hépatique constituant un travail dont l'ampleur aurait dépassé le cadre de cette thèse, nous nous sommes limités à l'étude de la tréhalase rénale ; les autres points de ce programme étant en cours de réalisation en collaboration avec d'autres chercheurs de notre équipe.

La purification de l'enzyme rénal a été effectuée par précipitation fractionnée des protéines et électrophorèse avec élution continue des fractions séparées. Nous sommes parvenus à une purification d'environ cent fois.

La préparation obtenue ne renferme pas d'autres osidases associés et semble spécifique d'un seul substrat, le tréhalose. L'étude de la cinétique enzymatique de la tréhalase des reins humains et des reins de Porc a été effectuée comparativement ; il en est de même de la recherche des différents effecteurs. Parmi ceux-ci, le saccharose et le phloridzozide ont inhibé les tréhalases du rein de l'Homme et du Porc ; nous étudions d'une

façon plus approfondie dans un chapitre particulier les caractéristiques de cette inhibition. La discussion nous permet enfin de comparer les propriétés de ces tréhalases rénales avec des tréhalases d'autres origines.

Avant d'exposer les résultats que nous avons obtenu, nous tenons à exprimer notre plus sincère reconnaissance et notre plus respectueuse admiration à notre Maître, Monsieur le Professeur Jean-Emile COURTOIS, qui après nous avoir accueilli comme interne et accordé toute sa confiance comme Attaché de Biologie dans son laboratoire de l'Hôpital Laënnec, nous a prodigué ses conseils inestimables et nous a enrichi de sa grande expérience, nous permettant ainsi d'achever ce travail dans d'excellentes conditions.

GENERALITES SUR LE TREHALOSE ET LES TREHALASES

1°) - Le tréhalose

Les tréhalases ($\alpha\alpha'$ glucoside 1 glucohydrolase, E.C. 3.2.1.28) sont des enzymes qui semblent agir spécifiquement sur le tréhalose et n'admettre que lui comme substrat. Le tréhalose est un disaccharide non réducteur résultant de l'association de deux molécules de glucose liées par leur groupement réducteur ; c'est l' α D glucopyranosyl 1-1' α D glucopyranoside. On peut concevoir trois formes isomères, $\alpha\alpha'$, $\alpha\beta'$ et $\beta\beta'$. Toutes ont été obtenues par synthèse ; mais seule la forme $\alpha\alpha'$ a été jusqu'à présent signalée chez les êtres vivants.

WIGGERS (61) en 1832 découvre ce disaccharide non réducteur dans l'ergot de seigle (Claviceps Purpurea) et le dénomme mycose. Vingt six ans plus tard, Marcellin BERTHELOT (7) l'obtient cristallisé à partir de la manne de Trehala de Perse.

Le trehala est le cocon qu'un insecte parasite Larinus maculatus édifie sur des chardons du genre Echinops. Le mot Trehala d'où le tréhalose tire son nom a été introduit en Europe par GUIBOURT et BERTHELOT. Il tire son origine, d'après Sadegh MOGHADAM (57) du mot "Téhérani" dont il n'est qu'une déformation. Le mot Trehala issu du mot Téhéran indique donc l'origine persanne du produit. BERTHELOT, logiquement, dénomma le corps isolé Tréhalose. C'est cette dénomination qui fut adoptée par la suite.

La répartition du Tréhalose est extrêmement variée (49) (8) (14). Il a été signalé dans de très nombreuses espèces des différents groupes de la classification. Signalons sa présence chez des bactéries en particulier dans les glycoprotéides des mycobactéries, chez les Champignons où BOURQUELOT (9) l'a obtenu cristallisé à partir de 142 espèces sur 212 étudiées. Il a été décelé dans de nombreuses espèces d'algues et de lichens. Ce n'est que plus tard qu'il fut caractérisé chez les animaux : protozoaires, plathelminthes, némathelminthes, mollusques et enfin chez tous les insectes, à certains stades de leur développement où il représente dans l'hémolymphe le principal sucre (62) (63) et sert de source d'énergie en particulier lors du vol.

La synthèse du tréhalose semble se faire essentiellement par l'intermédiaire de l'uridine diphosphoglucose donateur d' α glucose avec le glucose-6-phosphate comme accepteur ; la

synthèse du tréhalose phosphate est catalysée par un enzyme. Le tréhalose est alors mis en circulation par une phosphatase à partir du tréhalose phosphate. C'est ce mécanisme qui a été précisé pour expliquer la synthèse du tréhalose dans la levure par CABIB et LELOIR (13).

Par contre, le tréhalose n'a pas été mis en évidence chez les végétaux supérieurs et chez les vertébrés, ce qui fait émettre à COURTOIS et PERCHERON (22) l'hypothèse que ce disaccharide n'est peut-être que le vestige d'un "métabolisme archaïque" des hydrates de carbone. Il est cependant possible que le tréhalose soit synthétisé dans ces organismes mais que son existence soit fugace car l'enzyme présidant à sa destruction est encore plus largement répandu que son substrat. Les tréhalases, en effet ont été retrouvées chez de nombreux Mammifères sans qu'il ait été possible de mettre en évidence chez ceux-ci le tréhalose qui sert de substrat à ces enzymes. Très récemment, toutefois, SACKTOR (56) a pu mettre en évidence la formation de tréhalose dans le rein de Lapin.

2°) - Les tréhalases

C'est à BOURQUELOT que revient la découverte de la tréhalase en 1895 (10) (11) dans une préparation d'Aspergillus Niger.

Depuis elle a été retrouvée dans un très grand nombre d'organismes. Elle est présente en particulier dans tous ceux qui

contiennent du tréhalose et que nous avons précédemment cités. Mais elle existe également et avec une activité parfois élevée chez beaucoup d'êtres vivants, où il n'a pas été possible de mettre en évidence son substrat ; c'est le cas d'un grand nombre de poissons et de reptiles, FISCHER et NIEBEL (34)', LUKOMSKAJA et TARASOVA (47) et surtout de Mammifères où elle se trouve localisée dans la muqueuse de l'intestin grêle (34) (35) (26), le foie, le rein (47) et le sérum (12) (17).

Chez l'Homme, DAHLQVIST (28) signale sa présence régulière dans l'intestin grêle où elle est associée aux autres disaccharidases et où son activité est comparable à celle qui sont les plus actives ; son rôle au niveau de cet organe semble en principe évident ; comme toutes les autres disaccharidases, elle hydrolyse son substrat, ici le tréhalose apporté par l'alimentation ; il est toutefois assez étonnant que cet enzyme intestinal possède une telle activité alors que le tréhalose, à l'exception des champignons fait pratiquement défaut dans notre alimentation.

La tréhalase sérique a été étudiée par GEORGET (36) qui la retrouve dans le sang de tous les spécimens examinés. Son rôle est obscur car il ne semble pas que le tréhalose non hydrolysé traverse la paroi intestinale et ce sucre n'a jamais encore pu être mis en évidence dans le sang ; c'est ce qui nous a amené à tenter de trouver une origine et un rôle à cette disaccharidase présente dans le sang de la plupart des Mammifères et si largement répandue chez les êtres vivants.

enzymatique a simplement été arrêtée après l'hydrolyse, par passage du milieu d'incubation pendant cinq minutes dans un bain-marie porté à l'ébullition.

2°) - Détermination de l'activité enzymatique des tissus

Les organes humains sont prélevés pendant les quatre heures suivant le décès. Ils sont aussitôt lavés avec une solution de Na Cl à 9 pour 1000, puis broyés au mixer à 4°C dans leur poids de solution de Na Cl à 9 pour 1000.

Nous procédons alors à cinq congélations à - 20° suivies de décongélations lentes. Ce traitement a pour but de libérer l'enzyme des cellules. Nous centrifugeons dix minutes à 10 000 tours dans un centrifugeur réfrigéré à 4°C, puis nous déterminons l'activité tréhalasique du surnageant en suivant le protocole opératoire précédent. Les résultats sont exprimés en unités tréhalasiques par kilogramme d'organe frais.

Chapitre II - REPARTITION DE LA TREHALASE

1°) - Localisation chez l'Homme

Une activité tréhalasique a été mise en évidence dès 1962 dans le sérum de l'Homme par COURTOIS, DEBRIS et GEORGET (17) par la suite, GEORGET devait retrouver cette activité dans le liquide céphalo-rachidien, le liquide d'ascite et l'urine humaine (36).

Nous avons étudié la répartition de l'enzyme dans les principaux organes et tissus de l'Homme ; les résultats de nos essais se trouvent groupés dans le tableau I.

Dans ce tableau nous ne mentionnons pas l'intestin grêle de l'Homme qui possède une activité tréhalasique importante, objet d'une étude faite antérieurement par DAHLQVIST (26) (30) et AURICCHIO (4) (5).

T A B L E A U N ° I

Activité tréhalasique de divers organes et tissus de l'Homme

Les nombres du tableau correspondent aux unités tréhalasiques : micromolécules de tréhalose hydrolysées par minute à pH 5,4 et 37° par kilogramme d'organe frais.

Cerveau	0	Pancréas	0
Cervelet	0	Poumon	0
Foie	20	Prostate	0
(Bile)	25	Rate	0
Glandes sous-maxillaires	0	Rein	1250
Glandes surrénales	0	Thymus	0
Muscle squelettique	0	Hématies	0
Myocarde	0	Leucocytes	0

L'étude de ces résultats montre que, à l'exception de l'intestin grêle, le rein est l'organe de loin, le plus riche en tréhalase et que si on y adjoint le foie dont l'activité enzymatique est faible mais constante, ce sont les trois seuls organes susceptibles d'être à l'origine de la tréhalase sérique constamment retrouvée chez l'Homme.

Il faut remarquer aussi l'activité enzymatique

retrouvée dans la bile que nous avons étudiée ; cette découverte sera à l'origine d'autres travaux que nous exposerons plus loin et qui auront pour but de montrer la possibilité d'une élimination biliaire de la tréhalase. Cette bile a été prélevée par aspiration au niveau de la vésicule biliaire lors d'une intervention chirurgicale et elle est sans rapport avec le foie étudié dont l'activité tréhalasique se trouve rapportée dans ce tableau.

LUKOMSKAJA et TARASOVA (47) dont les travaux sont contemporains de cette étude ont également trouvé une faible activité dans le foie humain et une activité beaucoup plus importante dans le rein.

Nous avons alors étudié la répartition de la tréhalase chez quelques Mammifères. Nous nous sommes attachés à l'étude des organes ou liquides biologiques qui chez l'Homme avaient révélé la présence de l'enzyme.

2°) - Localisation de la tréhalase chez quelques Mammifères

Les tissus animaux ont été traités comme les tissus humains, avec la différence toutefois qu'ils ont été prélevés aussitôt après le sacrifice de l'animal. Nos divers résultats sont groupés dans le tableau II.

T A B L E A U N ° II

Activité tréhalasique de divers organes de Mammifères adultes

Les nombres du tableau correspondent aux unités tréhalasiques.

Animal		Rein	Foie	Bile	Sérum	Urines
Chien	I	1 100	35	75*	6,2	0
	II	2 100	210		3,8	2,3
	III	1 700	250		7,7	3,0
	IV	1 400	50		6,0	
Chat	I	1 160	12	0	0	0
	II	1 500	10	0	1,2	
	III	320	15	0	0	0
	IV	260	25			
Lapin	I	5 230	1 200	59	64	13
	II	4 680	78	52	40	
Rat blanc (d'élevage)	I	0	0		0,4	
	II	0	0		1,9	
Rat noir (sauvage)	I	0	0		0	
	II	0	0		0	
	III	0	0		0	
Odontora		400	70			

* Mélange des biles des animaux I - II - III.

Tous les animaux étudiés, à l'exception des rats, possèdent une tréhalase rénale et hépatique ; mais il existe une très

grande différence d'activité enzymatique d'un animal à l'autre dans la même espèce, ce qui ne permet pas de tirer de conclusions quantitatives sur des lots aussi restreints d'animaux.

Il existe toutefois des points importants à noter : le premier est l'existence d'une très faible activité tréhalasique, dans le sérum des rats d'élevage ; cette activité fait même défaut chez les rats sauvages qui semblent totalement dépourvus de tréhalase. En outre, il existe une élimination biliaire et urinaire chez tous les animaux possédant une activité tréhalasique sérique notable.

Par ailleurs tous ces animaux, et en particulier le rat, DAHLQVIST et BRUN (31), possèdent une tréhalase intestinale. Les résultats obtenus ne permettent pas de conclure à une origine intestinale, hépatique ou rénale de la tréhalase sérique: l'absence de tréhalase sérique chez les rats qui ne possèdent pas d'activité enzymatique rénale serait en faveur du rein, mais cette hypothèse est en contradiction avec les résultats obtenus chez les chats qui ont une forte activité rénale et une activité sérique nulle. Par contre, une origine hépatique n'est pas impossible.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par DAHLQVIST (26) (27) (29) (31) et LUKOMSKAJA (46) (47).

Chapitre III - TREHALASE SERIQUE DE L'HOMME

1°) - Adultes normaux et enfants

GEORGET (36) a effectué un grand nombre de déterminations d'activité tréhalasique du sérum humain. Les sujets choisis étaient exempts d'affections connues. Il a trouvé une moyenne d'activité pour 109 sujets sains, de 14,2 U. Tr. avec un écart type de 9,40. L'importance de l'écart type montre la grande dispersion des résultats obtenus chez des sujets normaux. Il a ensuite étudié les variations du taux de la tréhalase sérique chez le vieillard et il a conclu qu'il n'existait pas de modifications significatives du taux de l'enzyme en fonction de l'âge.

Nous avons nous-mêmes déterminé lors d'un travail effectué en collaboration avec J.E. COURTOIS et J.M. CHERON (15), l'activité enzymatique sérique de 61 enfants normaux. Nos résultats sont groupés dans le tableau III.

T A B L E A U N ° III

Activité tréhalasique des sérums d'enfants

Intervalle d'âge	Nombre de sujets	Moyenne d'âge	Activité tréhalasique	
			Moyenne	Valeurs extrêmes
0 à 30 jours	8	14 jours	0,6	0,4 à 0,7
1 à 3 mois	6	43 jours	0,8	0,6 à 1,0
3 à 7 mois	12	4,7 mois	1,65	0,5 à 4,5
7 à 13 mois	11	10 mois	1,84	0,9 à 4,0
13 à 24 mois	13	21,1 mois	2,57	1,5 - 4,0
2 à 6 ans	6	4 ans	4,66	3,8 - 6,0
6 à 11 ans	5	8,4 ans	11,5	7,0 à 20,5

Les chiffres groupés dans ce tableau montrent que l'activité tréhalasique augmente régulièrement depuis la naissance pour atteindre entre 6 et 11 ans, des taux identiques à ceux de l'adulte.

2°) - Variation du taux dans diverses affections

Cette étude a fait l'objet d'une partie de la thèse de GEORGET et nous n'avons fait que confirmer certains points qui nous semblaient utiles pour établir l'origine, le rôle et l'élimination de la tréhalase sérique.

Origine de la tréhalase sérique

Nous avons vu dans les chapitres précédents que trois organes peuvent être à l'origine de l'enzyme sérique, ce sont : l'intestin, le rein et le foie.

a) Origine intestinale

GEORGET, lors de ses premiers essais avait décelé un taux de tréhalase sérique très élevé chez un sujet diabétique. Il a alors examiné sans succès un grand nombre de sérums de diabétiques, dans l'espoir de trouver une explication à cette tréhalasémie élevée.

Son premier dosage remonte à 1962 et la tréhalasémie de ce diabétique était de 85 U. Tr. Nous avons suivi régulièrement ce sujet depuis cette époque et le taux de sa tréhalase sérique est toujours demeuré élevé et indépendant de sa glycémie. Les résultats de ces dosages sont groupés dans le tableau IV. Aucun examen complémentaire clinique ou biologique ne nous a permis jusqu'à ce jour d'expliquer la cause de cette hypertréhalasémie.

Nous avons vérifié qu'il n'existait pas chez ce sujet hypertréhalasémique un déversement de ses disaccharidases intestinales dans le sang. La tréhalase se trouve associée dans la muqueuse de l'intestin grêle, à diverses autres disaccharidases, DAHLQVIST (26) (27) (31) (29). Nous avons donc tenté de caractériser dans le sang de ce sujet une activité sucrasique, maltasique,

et lactasique ; pour cela nous avons remplacé le tréhalose dans la technique habituelle d'hydrolyse par 1 ml de solution M/20 du disaccharide à étudier et nous avons laissé incubé 6 heures à 37° et à pH 6,0 pour le saccharose et le maltose et 5,5 pour le lactose ; ces pH étant les pH optima des disaccharidases correspondantes. Le glucose libéré a été après incubation, déterminé par une technique à la glucose-oxydase. Nous n'avons décelé aucune activité appréciable de ces disaccharidases dans le sérum. Il ne semble donc pas qu'il y ait un passage de l'ensemble des disaccharidases de l'intestin vers le sang par un mécanisme quelconque, ou à la faveur d'une altération de la muqueuse intestinale.

T A B L E A U N ° IV

Teneur en tréhalase sérique d'un diabétique hypertréhalasémique

Date de l'analyse	Glycémie g/l	Activité tréhalasique	
		Sérum	Urine
23 - 2 - 62	1,75	85	
27 - 3 - 62	2,90	86	
27 - 9 - 62	2,80	58	
2 - 4 - 63	2,20	83	
26 - 11 - 64	1,50	53	4,5
12 - 5 - 65	2,10	75	6,0
7 - 12 - 67	1,10	76	
25 - 9 - 69	1,15	95	

Il existe un autre argument s'opposant à l'hypothèse d'une origine intestinale de la tréhalase sérique ; nous avons montré précédemment que le taux sérique de l'enzyme augmentait régulièrement avec l'âge chez l'enfant, or AURICCHIO et coll. (4) (5) ont établi qu'au cours du 3^{ème} mois de la vie foetale, la muqueuse de l'intestin grêle possédait une activité tréhalasique importante qui était supérieure à celle de l'adulte. Ils ont ensuite montré que chez quelques nouveaux-nés l'activité tréhalasique de l'intestin grêle était identique à celle de l'adulte. Il semble donc bien qu'il n'y ait pas de relation entre le taux de la tréhalase duodénale et celui de la tréhalase sérique, puisque la première atteint dès la naissance un taux important alors que la seconde augmente lentement avec l'âge chez l'enfant.

Ces arguments sont donc en désaccord avec une origine intestinale de la tréhalase sérique ; s'ils ne réfutent pas absolument la possibilité d'un passage de l'enzyme à travers la muqueuse de l'intestin grêle, il semble toutefois raisonnable de chercher ailleurs l'origine de l'enzyme sérique.

b) Origine rénale

Une origine rénale de la tréhalase est possible, nous avons vu en effet que tous les Mammifères étudiés possèdent une activité tréhalasique rénale très importante. Seul le rat ne possède pas de tréhalase dans son équipement enzymatique rénal, or, son activité tréhalasique est nulle ou très faible.

Chez l'Homme nous avons régulièrement trouvé une activité tréhalasique élevée dans le rein. Nous avons eu, d'autre part, la chance de pouvoir étudier les sangs de sujets ayant subi une néphrectomie bilatérale et qui sont maintenus en vie grâce à des hémodyalyses fréquentes. En supposant que la tréhalase sérique soit d'origine rénale on ne doit pas retrouver d'activité enzymatique après un certain temps chez ces sujets qui ne possèdent plus de reins.

Nous avons étudié six sujets ayant subi une néphrectomie bilatérale, nos résultats sont groupés dans le tableau V.

T A B L E A U N ° V

Activité tréhalasique de sérums de sujets binéphrectomisés

Sujet	1		2	3		4		5		6	
Sexe	♀		♂	♀		♂		♂		♀	
Age	28 ans		22 ans	16 ans		33 ans		24 ans		35 ans	
Intervalle entre l'intervention et le prélèvement de sang (en jours)	0	90	30	240	360	17	24	0	23	270	277
Activité en unités tréhalasiques	8,7	16,2	5,4	15,4	13,6	5	10	2,7	1,5	3,2	4,9

On remarque qu'il persiste une activité tréhalasique souvent importante dans le sérum de ces malades même lorsqu'ils sont privés de leurs deux reins depuis plusieurs mois. Ces sujets sont soumis périodiquement à des transfusions de sang ; nous avons vérifié que l'apport en tréhalase par le sang conservé pouvait être considéré comme négligeable ; nous avons d'autre part, vérifié que les membranes utilisées pour l'hémo-dialyse ne laissaient pas diffuser la tréhalase sérique dans le liquide de dialyse.

Le taux moyen de la tréhalasémie des 9 essais est de 8,3 U. Tr. ; l'activité enzymatique sérique de ces malades est inférieure à celle des individus normaux. Il est donc possible qu'une partie de l'enzyme sérique provienne du rein, mais ces essais montrent surtout qu'il persiste une forte activité sérique après néphrectomie bilatérale et que la majeure partie de la tréhalase sérique n'est pas d'origine rénale.

Un autre fait confirme que la totalité de l'enzyme retrouvé dans le sang n'est pas d'origine rénale, c'est la présence d'une activité tréhalasique faible mais constante, trouvée dans le sang des rats blancs dont les reins semblent totalement dépourvus de tréhalase.

c) Origine hépatique

Nous avons vu qu'une origine intestinale de la tréhalase sérique est peu probable. L'origine rénale d'une partie de l'enzyme est possible mais l'étude de la tréhalasémie chez les

sujets binéphrectomisés montre bien que la totalité de l'enzyme sérique n'est pas d'origine rénale. A côté de ces deux organes très riches en enzyme et qui pouvaient être la source de la tréhalase sérique, il reste le troisième organe où nous avons décelé une activité tréhalasique : le foie. Bien que son activité soit très faible chez la plupart des Mammifères, et en particulier chez l'Homme, il est possible que cet organe procède à la synthèse de l'enzyme et à sa mise en circulation dans le sang. Nous avons étudié un certain nombre de malades atteints de cirrhose, affection où les fonctions cellulaires hépatiques sont perturbées et en particulier où les fonctions de synthèse sont altérées. Nous avons pris comme témoin de cette altération la diminution de la synthèse du cholestérol, de l'albumine et de la prothrombine.

Nos résultats sont groupés dans le tableau VI.

T A B L E A U N ° VI

Activité tréhalasique sérique de sujets cirrhotiques

Sujet n°	Sérum albumine		Cholestérol en g/l	Prothrombine en g/l %	Tréhalase U. Tr.
	en g/l	en % des protéines			
1	30	50	1,55	60	5,80
2	27	45	1,75	65	4,20
3	24	42	1,60	65	1,50
4	27	48	1,45	55	7,10
5	30	50	1,25	50	4,90
6	30	49	0,95	55	5,40
7	33	52	1,30	60	4,40
8	30	48	1,55	60	11,10
9	27	40	1,0	50	2,80
10	27	43	0,95	45	4,20
11	26	45	1,60	50	4,60
12	26	47	1,30	45	1,00
13	23	42	1,10	30	2,60
14	30	49	1,25	55	1,30
15	27	52	1,20	60	1,60
16	25	50	0,95	35	0,50

Quelques remarques sont nécessaires en ce qui concerne les techniques que nous avons employées pour déterminer la teneur du sérum en albumine, cholestérol et prothrombine. Chez nos sujets normaux, la teneur en sérum albumine ne descend jamais en dessous de 35 g/l et son pourcentage des protéines totales oscille entre 55 et 65 % ; le cholestérol est en général supérieur à 1,80 g/l. Le taux de prothrombine est l'expression en pourcentage de la normale, du temps de Quick qui explore trois des quatre facteurs dont la synthèse hépatique est en partie soumise à la vitamine K (prothrombine, proconvertine et facteur Stuart) et la proaccélélerine dont le taux est indépendant de celui de la vitamine K.

Les chiffres du tableau VI montrent clairement une nette diminution de l'activité tréhalasique sérique de ces malades ; à l'exception des sujets n° 4 et 8, tous possèdent une tréhalasémie inférieure à 6 unités ; la moyenne des activités enzymatiques des 16 sujets est de 3,9 U. Tr., chiffre très nettement inférieur à celui déterminé par GEORGET sur 106 sujets normaux, et qui était de 14,16 U. Tr. (36). L'altération des fonctions de synthèse du foie provoque donc une nette diminution de l'activité tréhalasique du sang ce qui est en faveur d'une origine hépatique d'une partie au moins de cet enzyme.

En conclusion

L'origine hépatique de l'enzyme est probable, toutefois, il semble qu'une partie de la tréhalase sérique provienne

du rein, qui est de loin l'organe le plus riche en cet enzyme.

3°) - Elimination de la tréhalase

Le problème de l'élimination de l'enzyme semble être en partie résolu. Il semble bien en effet, qu'une partie de la tréhalase soit éliminée par filtration ou excrétion au niveau du rein, GEORGET (36), bien qu'une desquamation cellulaire dans la lumière des tubules puisse expliquer la faible activité tréhalasique retrouvée dans l'urine ; l'enzyme a en effet été localisé par histochimie dans les cellules des tubes proximaux, SAKTOR (55).

Le taux régulièrement élevé de la tréhalasémie que nous avons retrouvé au cours des ictères par obstruction nous a incité à effectuer parallèlement et simultanément des dosages de tréhalase dans le sérum et dans la bile chez un certain nombre de sujets ; la bile a été recueillie au cours d'interventions chirurgicales au niveau du foie, par drainage de bile vésiculaire ; une ponction de sang veineux a été effectuée en même temps chez ces malades pour déterminer l'activité tréhalasique sérique.

T A B L E A U N ° VII

Comparaison des activités tréhalasiques
de la bile et du sérum d'un même sujet

Sujets	Activité tréhalasique	
	Sérique	Biliaire
N° 1	6,2	9,5
N° 2	7,0	21,0
N° 3	14,5	16,3
N° 4	10,2	9,3
N° 5	15,7	17,0
N° 6	14,2	19,3
N° 7	11,5	13,2
N° 8	12,5	10,8

Les résultats groupés dans le tableau VII montrent que la bile possède une activité tréhalasique importante et que cette activité dans six cas sur huit est supérieure à celle du sérum qui lui correspond. Ces résultats et l'observation de taux sériques élevés de la tréhalase au cours d'ictères obstructifs prouvent l'existence d'une élimination biliaire d'une partie de l'enzyme.

Tous les échantillons de sang humain étudiés par

GEORGET (36) et par nous-mêmes ont révélé la présence d'une nette activité tréhalasique. Nous avons montré qu'un certain nombre d'arguments expérimentaux semblaient exclure l'origine intestinale de l'enzyme qui semble provenir pour une grande part du foie avec toutefois une participation rénale dont l'importance reste à préciser.

Le mode d'excrétion de la tréhalase semble élucidé. En effet à côté de la fraction d'enzyme catabolisé nécessairement comme protéine, l'activité tréhalasique retrouvée dans l'urine, GEORGET (36), et dans la bile permet de penser qu'une partie au moins de l'enzyme est éliminée par le rein dans l'urine et par le foie dans la bile.

4°) - Action inhibitrice du Phloridzoside

La grande richesse du rein en tréhalase permet d'émettre une hypothèse concernant le rôle de l'enzyme dans cet organe : il est possible, en effet, que la tréhalase participe au processus actif de résorption tubulaire du glucose à un stade quelconque de ce mécanisme. Rappelons que l'enzyme a été localisé en bordure des tubes proximaux par histochimie (55). On sait d'autre part que le phloridzoside a une action inhibitrice sur la résorption tubulaire du glucose et que son injection provoque une glycosurie sans hyperglycémie. Nous avons donc pensé que si la tréhalase intervenait dans le processus de réabsorption du glucose, il est possible que l'inhibition par le phloridzoside de cette réabsorp-

tion ait pour point d'impact la tréhalase rénale. Nous avons donc recherché une éventuelle inhibition in vitro de la tréhalase par le phloridzocide.

Pour cet essai nous avons choisi trois sérums possédant une activité tréhalasique assez élevée (le sérum n° 1 correspond à notre sujet hypertréhalasémique) ; et nous avons procédé à l'hydrolyse enzymatique en absence et en présence de phloridzocide à la concentration de M/100 dans le milieu. Nos résultats sont groupés dans le tableau VIII.

T A B L E A U N ° VIII

Action du phloridzocide sur la tréhalase sérique

Sérum N °	Activité tréhalasique (U. Tr.)		Pourcentage d'inhibition
	Sans Phloridzocide	Avec Phloridzocide M/100 dans le milieu	
1	46	28,8	37 %
2	16	10,8	32 %
3	14,5	8,6	41 %

Les valeurs obtenues montrent que le phloridzoside possède une action inhibitrice intense sur la tréhalase du sérum humain. Nous verrons plus loin qu'il en est de même pour la tréhalase du rein. Il est possible que cette inhibition puisse expliquer l'activité glycosuriant de phloridzoside. Si cette hypothèse est vraie nous pouvons procéder à l'expérience suivante ; le rat ne possède pas de tréhalase rénale contrairement aux autres Mammifères que nous avons étudiés. Si nous injectons du phloridzoside à cet animal et que le point d'impact de l'action glycosuriant de cet hétéroside soit la tréhalase, on peut supposer que le rat ne possédant pas cet enzyme dans son équipement enzymatique rénal ne présentera pas de glycosurie après injection de phloridzoside.

Nous avons donc soumis deux cobayes de 300 g et deux rats blancs d'élevage de 150 g à un régime riche en glucides pendant huit jours en vérifiant l'absence de glucose dans leurs urines. Puis nous avons injecté par voie sous cutanée dans la face interne de la cuisse de chaque animal, une solution de phloridzoside à 4 mg par ml, à raison de 2 ml pour les cobayes et 1 ml pour les rats. Dans tous les cas, les urines recueillies ont montré une élimination précoce et massive de glucose après injection de phloridzoside. Nous avons vérifié par chromatographie sur papier qu'il s'agissait bien de glucose et qu'il n'était accompagné d'aucun autre ose ou oligosaccharide.

En conclusion, le cobaye qui possède une tréhalase rénale et le rat qui n'en possède pas, éliminent du glucose dans leurs urines sous l'action d'une injection sous-cutanée de

phloridzozide ; il semble bien que si la tréhalase intervient dans la réabsorption active du glucose par le rein, le point d'impact de l'action diabétogène de cet hétéroside ne soit pas la tréhalase.

VAN HANDEL, à l'aide d'autres arguments arrive à la même conclusion (60) : il injecte du glucose marqué à des lapins et à des rats et montre qu'il n'y a pas formation de tréhalose marqué dans les reins de ces animaux. Mais tout récemment, SACKTOR (56) incubant des tranches de reins de lapin avec du glucose marqué, a réussi à caractériser de faibles quantités de tréhalose marqué dans ces fragments de rein. Il a préconisé pour arriver à ce résultat, d'abréger au maximum le temps de l'incubation et de détruire aussitôt après celle-ci, la tréhalase contenue dans l'organe. Cette découverte très récente confirmerait l'hypothèse émise par COURTOIS (18) puis par SACKTOR (55) selon laquelle la réabsorption du glucose au niveau des tubules rénaux pourrait conduire à la formation de tréhalose et que la tréhalase présente à ce niveau pourrait avoir pour rôle de remettre en circulation le glucose mobilisé dans ce disaccharide.

A ce stade de notre travail, il nous a semblé que la façon la plus fructueuse de faire progresser nos connaissances sur l'origine et le rôle de la tréhalase sérique était d'étudier les tréhalases localisées dans les différents organes de façon à comparer leurs propriétés à celles de l'enzyme sérique.

L'étude approfondie des tréhalases rénale, intestinale et hépatique, dépasse en importance le but assigné à ce travail qui ne constitue qu'une contribution à l'ensemble des travaux

effectués par notre équipe.

Le rein étant de loin l'organe le plus riche en tréhalase, nous avons choisi de purifier et d'étudier la tréhalase rénale de l'Homme. Comme il nous était plus aisé de nous procurer des reins de Porc, c'est sur ceux-ci que nous avons effectué nos recherches préliminaires pour établir le protocole d'extraction et d'étude de l'enzyme de façon à procéder d'une manière bien codifiée à l'étude de la tréhalase du rein humain chaque fois que nous pourrions disposer d'échantillons de cet organe.

Le protocole d'extraction que nous présentons est donc celui que nous avons mis au point avec des reins de Porc, il sera suivi des résultats que nous avons obtenus avec des reins humains.

révélateur par une solution de chlorure ferrique à 2 ‰ qui révèle respectivement le phloridzozide en brun rouge, le naringozide en brun violacé, le phlorétol en violet mauve, et le naringétol en brun chocolat.

B) Les reins de Porc, prélevés aussitôt après le sacrifice de l'animal, sont débarrassés du panicule graisseux qui les entoure ; on élimine la zone médullaire et on les lave abondamment dans une solution de Na Cl à 9 ‰ stérile pour éliminer la plus grande partie du sang. On ne conserve en effet que la zone corticale qui contient la presque totalité de l'enzyme, LUKOMSKAJA et TARASOVA (47).

C) La détermination de l'activité tréhalasique se fait selon la technique décrite précédemment pour l'étude des organes de Mammifères, seul le pH du milieu d'incubation change, il est ici de 5,6.

D) Les résultats sont souvent exprimés en nombre d'unités tréhalasiques par gramme de protéines, c'est ce que nous avons appelés activité spécifique (A.S.). La teneur en protéines des solutions est évaluée par spectrophotométrie à 280 nm. L'étalonnage de l'appareil a été réalisé à l'aide d'échantillons de sérums humains, dont les protéines totales ont été déterminées par gravimétrie après précipitation par l'alcool acétone et lavage à l'éther.

Chapitre II - SEPARATION DE L'ENZYME

La zone corticale du rein est broyée pendant dix minutes dans un mixer en présence de deux fois son poids de mélange extractif glacé dont la composition est la suivante :

- Tampon acide acétique M/l - soude, dé pH 5,2 ... 30 ml
- Eau distillée 70 ml
- n. octanol 5 ml

Nous avons choisi le pH de 5,2 parce que dans ces conditions, nous pouvons éliminer une partie des protéines inactives qui sont insolubles à ce pH. Nous obtenons ainsi une suspension très homogène du tissu, qui est congelée, à moins vingt degrés puis décongelée lentement à la température du laboratoire. Nous avons obtenu le maximum de rendement en procédant à quatre congelations puis décongelations successives.

Le mélange est alors centrifugé dans un centrifugeur réfrigéré à + 4°C pendant 30 minutes à 10.000 tours/minute.

On obtient ainsi une fraction liquide qui est limpide et qui possède une forte activité tréhalasique, c'est cette fraction qui servira à la purification de l'enzyme. Elle est surmontée par la phase octanol qui contient des lipides et d'autres substances émulsionnées. On l'élimine ainsi que le culot. L'un et l'autre ont une très faible activité tréhalasique. L'octanol que nous avons utilisé augmente le rendement de l'extraction en empêchant la formation de mousses lors du broyage au mixer ;

ces mousses, en effet, retiennent une grande quantité d'enzyme ; le tableau IX montre l'augmentation du rendement de l'extraction en présence d'octanol et de tampon.

L'octanol semble libérer la tréhalase d'associations qu'elle formerait avec certaines protéines de l'homogénat. En effet, en absence d'octanol, la tréhalase est insolubilisée par le sulfate d'ammonium à demi-saturation ; alors qu'en présence d'octanol elle ne s'insolubilise que pour une concentration en sulfate d'ammonium située entre 50 et 75 % de saturation. D'autre part, à l'électrophorèse sur cellogel à pH 8,6, les protéines contenant l'activité tréhalasique migrent au niveau des α_1 globulines si l'extrait a été effectué en présence d'octanol sinon elles restent sur la ligne de dépôt, ou bien migrent comme les γ globulines lentes.

T A B L E A U N ° IX

Liquide extractif	Protéines (g/l)	Unités tréhalasiques (par l.)	Activité spécifique
Eau distillée	32	7 130	223
Tampon pH 5,2	21	6 670	318
Tampon pH 5,2 et octanol	22	8 912	405

Il semble donc que l'octanol libère la tréhalase d'une association qu'elle formerait avec une autre protéine, cette association ne migrant pas à l'électrophorèse dans les conditions précédentes et précipitant par le sulfate d'ammonium à demi-saturation ; il est également possible que l'octanol provoque la rupture d'éléments particuliers comme les lysosomes qui libéreraient ainsi l'enzyme qu'ils contiennent.

Chapitre III - PURIFICATION DE L'ENZYME

a) - Précipitation par le sulfate d'ammonium

On procède à deux précipitations successives, l'une à 50 % de saturation du sulfate d'ammonium dans le milieu, l'autre à 75 %. On élimine le premier précipité et on conserve le second.

Le mode opératoire est le suivant ; on refroidit à 4°C l'extrait limpide obtenu lors de l'étape précédente et on lui ajoute progressivement du sulfate d'ammonium en agitant continuellement et à raison de 35 g de sel pour 100 ml de l'extrait à pH 5,2. On laisse en contact et en agitant pendant une heure, puis on centrifuge à 4°C pendant 60 minutes à 10 000 tours/minute. Le précipité obtenu possède une faible activité spécifique 42 ; elle correspond environ au dixième de l'activité spécifique du liquide initial. On élimine ce précipité. On additionne alors le liquide surnageant d'une quantité de sulfate d'ammonium telle qu'on obtienne une concentration équivalente à 75 % de saturation en sel. Pour calculer la quantité à ajouter, nous avons employé la formule de KUNITZ (43)

$$\frac{53,3 (S_2 - S_1)}{1 - 0,3 S_2}$$

On obtient par cette formule la quantité de sulfate

d'ammonium à ajouter à 100 ml d'une solution de concentration S_1 pour l'amener à la concentration désirée S_2 .

Cette opération est effectuée à + 4°C en agitant constamment. Le précipité formé après une heure est recueilli comme précédemment par centrifugation. Il contient toute l'activité tréhalasique. On le reprend par un minimum d'eau glacée et on dialyse 24 heures à 4°C contre de l'eau pour éliminer le sulfate d'ammonium. Cette fraction correspond aux protéines précipitées entre 50 et 75 % de saturation en sulfate d'ammonium, son activité spécifique est de 585 donc supérieure d'environ 10 fois à celle de la mixture initiale.

T A B L E A U N ° X

Purification de l'enzyme par précipitations fractionnées
au sulfate d'ammonium

Différentes étapes	Protéines g/l	Glucose libéré mg/l	U. Tr.*	Act. Spéc*
- Extrait total issu des gels-dégels	29	1 240	5 740	198
- Extrait total centrifugé . surnageant	23	1 220	5 650	246
- Précipitation au $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$. Insoluble à 50 %	18,5	200	925	42
. Insoluble entre 50 et 75 %	21,0	3 200	12 300	585
. Surnageant de 75 %	4,0	100	460	115

* cf. tableau I

b) Electrophorèse en élution continue

Nous avons utilisé un appareil à électrophorèse horizontale couplée à une élution verticale continue par le tampon. L'appareil est un Beckman - Spinco - Modèle C.P., monté en enceinte réfrigérée.

Le tampon de pH 8,6 a la composition suivante pour un litre d'eau :

- barbital 0,74 g
- barbital sodique 4,10 g.

Sa force ionique est de 0,02. Une intensité constante de 2 milliampères/cm est appliquée aux bornes. Celles-ci sont réunies par une feuille de papier spécial dont la partie inférieure est découpée en 32 dents. Les dents correspondent à 32 tubes où sont collectées séparément les fractions isolées par électrophorèse.

Une première électrophorèse est pratiquée sur la préparation précédente. L'activité tréhalasique se trouve distribuée dans les tubes numérotés de 7 à 12. On réunit le contenu de ces tubes ; on dialyse 24 heures à 4°C contre de l'eau, puis on le concentre au cinquième en faisant passer un courant d'air à 4°C autour du cylindre de cellophane utilisé pour la dialyse.

Cette solution concentrée est alors soumise à une nouvelle électrophorèse dans les mêmes conditions. L'activité tréhalasique se trouve dans les tubes ayant les mêmes emplacements que lors de la première manipulation. L'activité spécifique est

maximum dans les tubes 10 et 11 ; on réunit leur contenu que l'on dialyse.

T A B L E A U N ° XI

Répartition de l'activité tréhalasique en fonction
du taux de protéines dans les fractions collectées
après électrophorèse

Numéro des tubes	7	8	9	10	11	12
Unités tréhalasiques par litre	1 240	4 259	7 730	5 800	5 220	463
Activité spécifique (A. S.)	830	2 840	2 580	5 800	5 220	926

Les chiffres du tableau XI montrent que les tubes 10 et 11 possèdent une activité environ 10 fois supérieure à celle de la préparation obtenue par fractionnement au sulfate d'ammonium. L'activité spécifique de la préparation a donc été augmentée de 100 fois par rapport à celle de la pulpe originale.

Cette préparation a été concentrée cinq fois et soumise à une électrophorèse sur cellogel en tampon barbital-barbital sodique de pH 8,6. La migration n'a permis de déceler qu'une seule bande de protéines dont la mobilité est très

voisine de celle des α_1 globulines du sérum humain. Cette bande découpée et éluée avec de l'eau distillée possède la totalité de l'activité tréhalasique de la préparation.

Nous avons procédé exactement de la même façon à partir de deux reins humains pour purifier la tréhalase qu'ils contiennent. Nous avons obtenu également une purification d'environ 100 fois de l'enzyme rénal humain, mais les préparations obtenues présentent des activités spécifiques inférieures d'environ dix fois à celles obtenues à partir des reins de Porc.

Le tableau XII rassemble les résultats obtenus au cours de cette purification.

T A B L E A U N ° XII

Purification de la tréhalase rénale humaine

Reins	U. Tr. par kg d'organe frais	Activité spécifique		
		Extrait initial	Fraction obtenue par précipitation au sulfate d'ammonium entre 50 et 75 %	Préparation finale
N° 1	550	6,3	48	450
N° 2	400	5,8	55	350

Nous avons pensé que le stade de purification atteint était suffisant pour le travail que nous nous étions assigné et qu'une purification plus poussée de l'enzyme dans le but d'étudier sa structure ferait l'objet d'un travail ultérieur de notre équipe de recherches.

c) - Recherche des activités enzymatiques associées et
spécificité d'action

Avant d'entreprendre l'étude de la cinétique enzymatique des préparations obtenues, nous avons vérifié l'absence d'activités enzymatiques associées et étudié la spécificité des tréhalases rénales porcine et humaine.

Un volume déterminé de préparation enzymatique est additionné de 0,5 ml de tampon acide acétique M/l soude de pH 5,6 et de 1 ml de solution M/20 du saccharide ou de l'hétéroside à étudier ; le volume du mélange réactionnel est amené à 5 ml avec de l'eau distillée. Après 12 heures d'incubation à 37°, on détermine le pouvoir réducteur vis-à-vis du réactif cupro-alcalin par la méthode de NELSON-SOMOGYI.

Nous avons ainsi étudié l'action de nos préparations enzymatiques de Porc et d'Homme sur les corps suivants :

- 1 - Corps à liaison α D glucosidique : Saccharose, maltose, palatinose, α méthyl-D-glucoside, α phényl-D-glucoside.

- 2 - α -phényl-D-galactoside
- 3 - β -phényl-D-glucoside
- 4 - Deux dérivés non symétriques du tréhalose :
1' α -D-galactosido-6-tréhalose et 1'anhydro-3,6
tréhalose. Ces deux corps ont été synthétisés
par PERCHERON et GUILLOUX (50), (39) qui nous en
ont obligeamment donné pour pratiquer ces essais.

Les préparations enzymatiques de Porc et d'Homme n'ont hydrolysé aucun de ces corps, ce qui montre que 1' α galactosidase rénale étudiée par DEBRIS, COURTOIS et PETEK (32) a été éliminée, on n'observe en effet, aucune hydrolyse de 1' α phényl-D-galactoside ni de 1' α -D-galactosido-tréhalose, de même la β glucosidase rénale de ROBINSON, PRICE et DANCE (52), (54) a été éliminée par notre purification.

Enfin la préparation demeure sans action sur les divers corps à liaison α glucosidique et les dérivés du tréhalose, étudiés.

Avec les deux dérivés du tréhalose nous avons vérifié par chromatographie descendante sur papier que ces deux corps n'avaient subi aucune hydrolyse et qu'aucun ose n'avait été libéré.

Ces essais montrent la grande spécificité des tréhalases rénales qui n'attaquent pas un substrat aussi proche du tréhalose que l'est 1'anhydro-3-6-tréhalose.

Chapitre IV - ETUDE DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE DES TREHALASES
RENALES

A) - Rein de Porc

1° - Détermination du pH optimum

Nous avons employé pour la détermination du pH optimum un tampon acide citrique-phosphate disodique d'après M.c ILVAINE. Ce tampon dont la composition résulte du mélange de quantités déterminées de solutions d'acide citrique 0,1 molaire et de phosphate disodique dihydraté 0,2 molaire, couvre une gamme de pH s'étendant de 2,2 à 8.

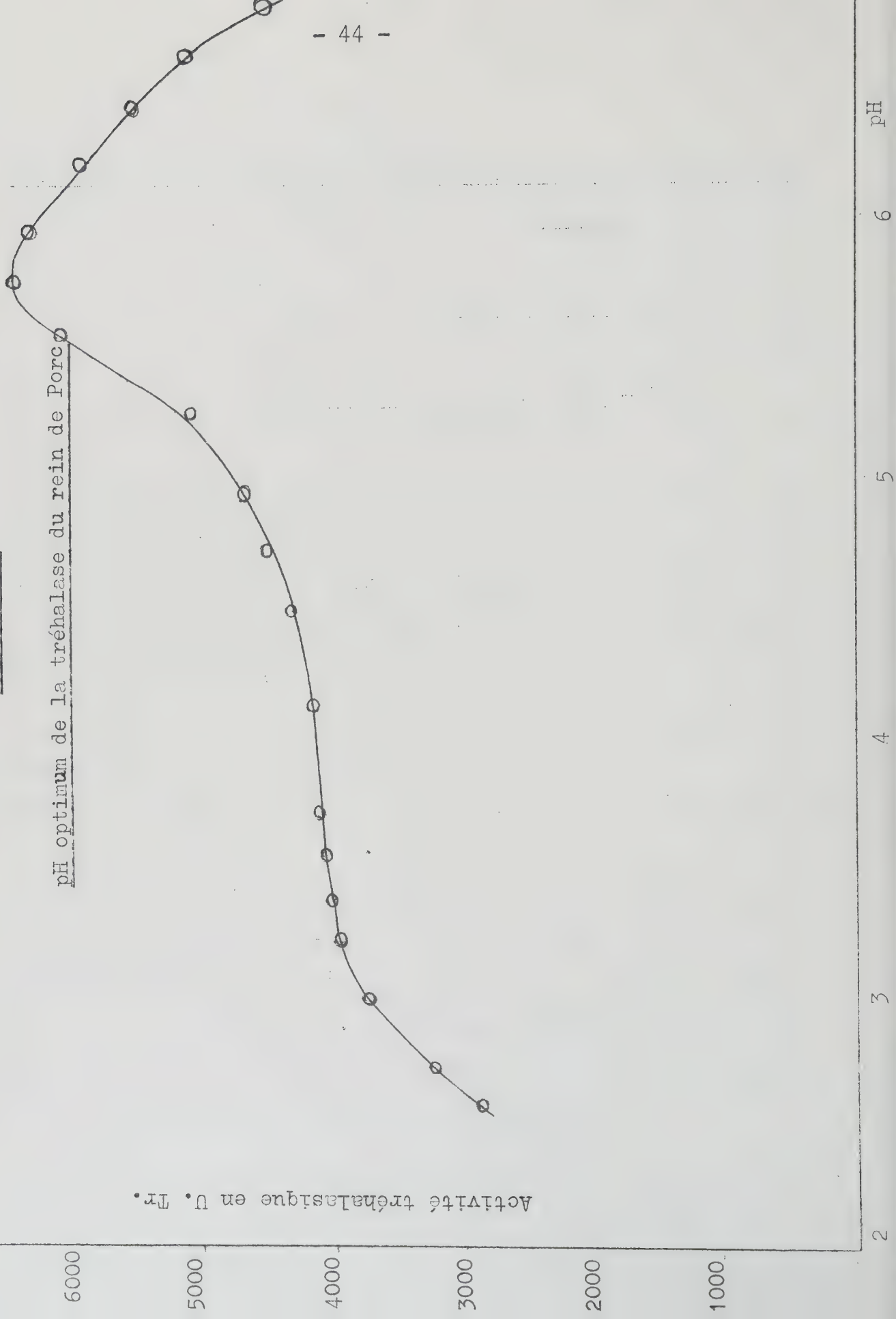
Le tréhalose était M/100 dans le milieu et la quantité d'enzyme dilué employée, telle que les déterminations s'effectuent en solution saturante en substrat.

Les résultats sont représentés sur la courbe 1. Le pH optimum de l'enzyme se situe à 5,7. La progression est très lente, de pH 3,0 à 5,0 et la diminution de l'activité enzymatique très rapide du côté des pH alcalins.

Figure n° 1

pH optimum de la tréhalase du rein de Porco

Activité tréhalasique en U. Tr.



2° - Hydrolyse du substrat en fonction du temps

Un essai préalable nous a permis de déterminer la quantité de dilution d'enzyme à ajouter au milieu d'incubation pour nous trouver en vitesse initiale. Le milieu d'incubation était constitué par une solution de tréhalose tamponnée à pH 5,7 par un tampon acétate de sodium-acide acétique M/10 dans le milieu. Le tréhalose se trouvait à la concentration de M/100 dans le milieu. A partir de ce dernier, nous avons effectué des prélèvements toutes les 30 minutes puis toutes les 60 minutes pendant 6 heures. L'activité enzymatique était arrêtée par addition de réactif cupro-alcalin de SOMOGYI.

Sur chacun de ces échantillons, nous avons déterminé la quantité de glucose libéré par l'hydrolyse enzymatique du tréhalose. Nous avons ensuite calculé le pourcentage de substrat hydrolysé en fonction de la durée de l'incubation.

La courbe 2 représente la relation entre l'hydrolyse du tréhalose et le temps d'incubation.

A partir de ces données expérimentales nous avons calculé la constante de WILHELMY K. à l'aide de l'équation établie par celui-ci :

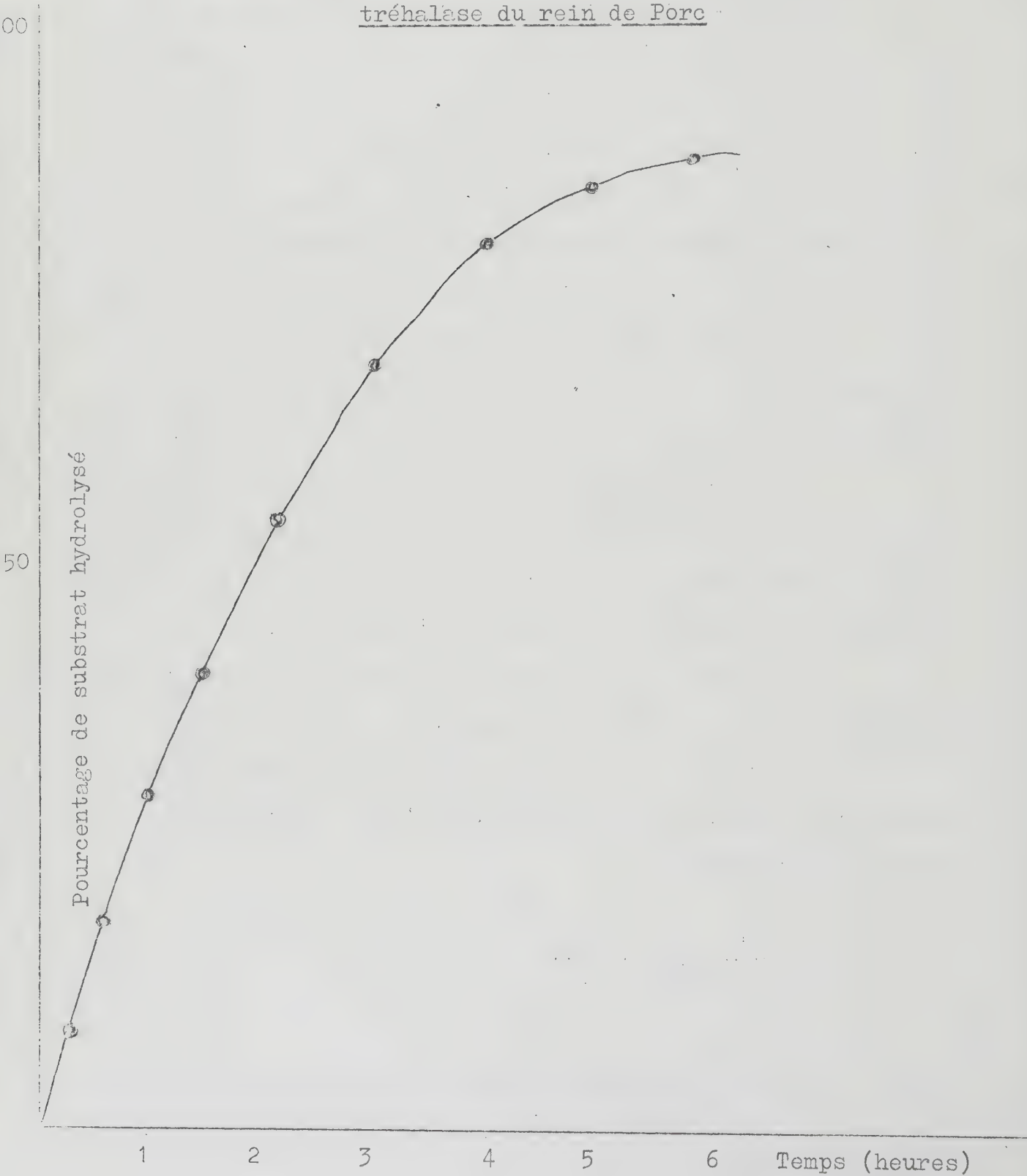
$$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a - x}$$

où t est la durée de l'hydrolyse exprimée en secondes,

a : la concentration initiale en substrat (100 %

Figure N° 2

Hydrolyse du tréhalose en fonction du temps par la
tréhalase du rein de Porc



correspondant à une concentration de M/100 en tréhalose dans le milieu).

x : le pourcentage de substrat hydrolysé au temps t.

log : logarithmes naturels.

Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau XIII.

T A B L E A U N ° XIII

Hydrolyse du tréhalose en fonction du temps

Durée de la réaction (en minutes)	15	30	60	90	120	180	240	300	360
Pourcentage de substrat hydrolysé	8,3	19,2	30,2	41,5	56,0	70,0	80,0	84,0	85,5
Constante de WILHELMY $K \times 10^5$ *	9,06	11,8	9,8	9,8	11,3	11,0	11,1	10,0	9,0

$$* K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x} ; t, \text{ durée de l'hydrolyse en}$$

secondes ;

x, pourcentage du substrat hydrolysé au temps t ;

a, concentration initiale du substrat ;

log naturels.

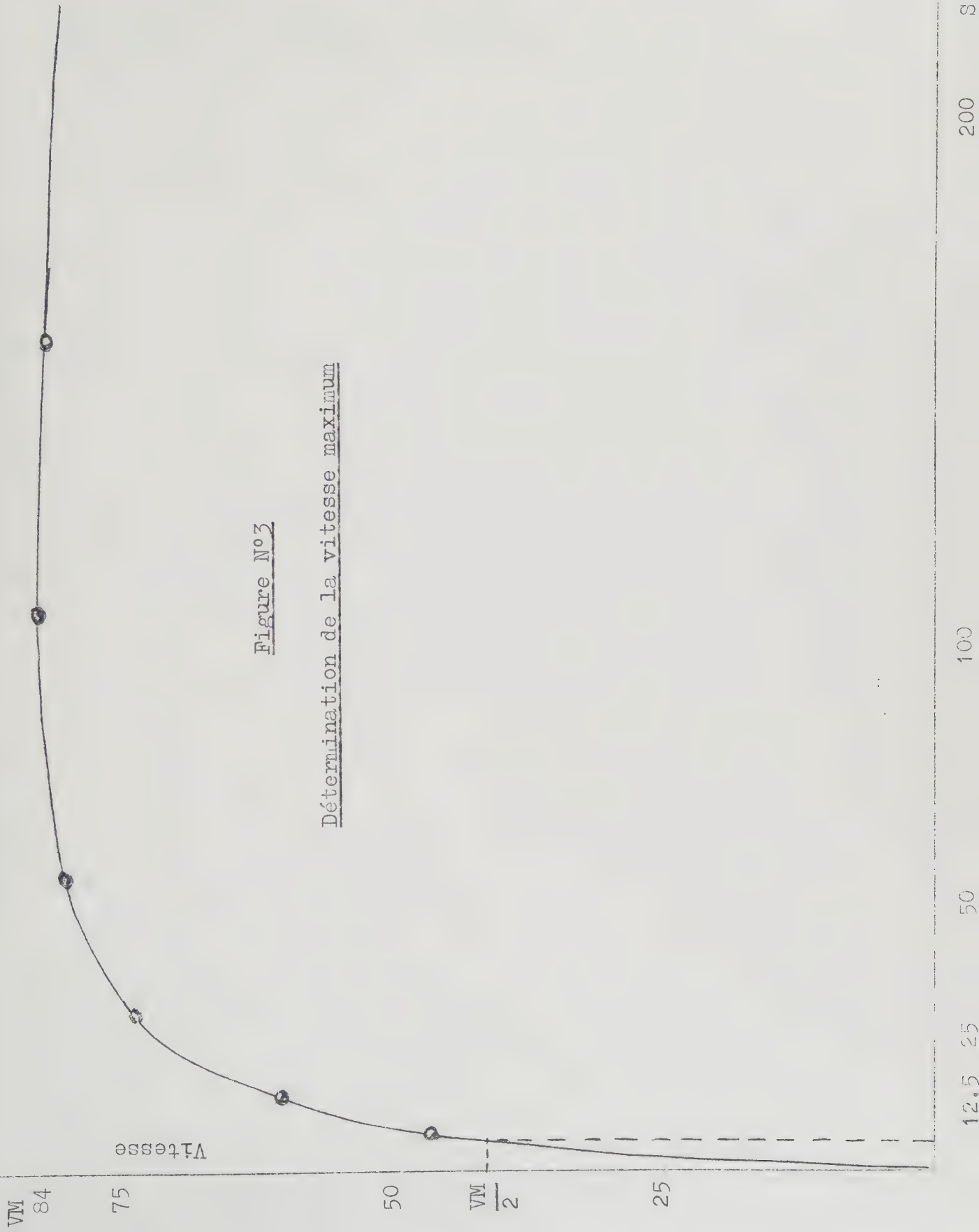
L'examen de ces résultats montre que la réaction évolue comme une réaction du premier ordre. Les valeurs de K ne sont pas très différentes tout au long de l'hydrolyse, ce qui montre que le glucose libéré n'exerce par d'inhibition compétitive ; de plus, la réaction d'hydrolyse du tréhalose ne s'accompagne pas de réactions de transferts de glucose sur le tréhalose (absence de transosylations).

3° - Détermination de la vitesse maximum

Nous avons opéré à pH 5,7 pendant 45 minutes à 37° en présence de concentrations croissantes de substrat allant de M/2 à M/160 dans le milieu ; les résultats sont représentés sur la figure 3 où la vitesse (nombre de μ moles de tréhalose hydrolysées par minute) est représentée en ordonnées et la concentration en substrat en abscisses, exprimée en millimoles de tréhalose dans le milieu ; la courbe s'infléchit et devient une droite parallèle à l'axe des abscisses pour une vitesse de 84 micromoles par minute qui représente la vitesse maximum.

Détermination de la vitesse maximum

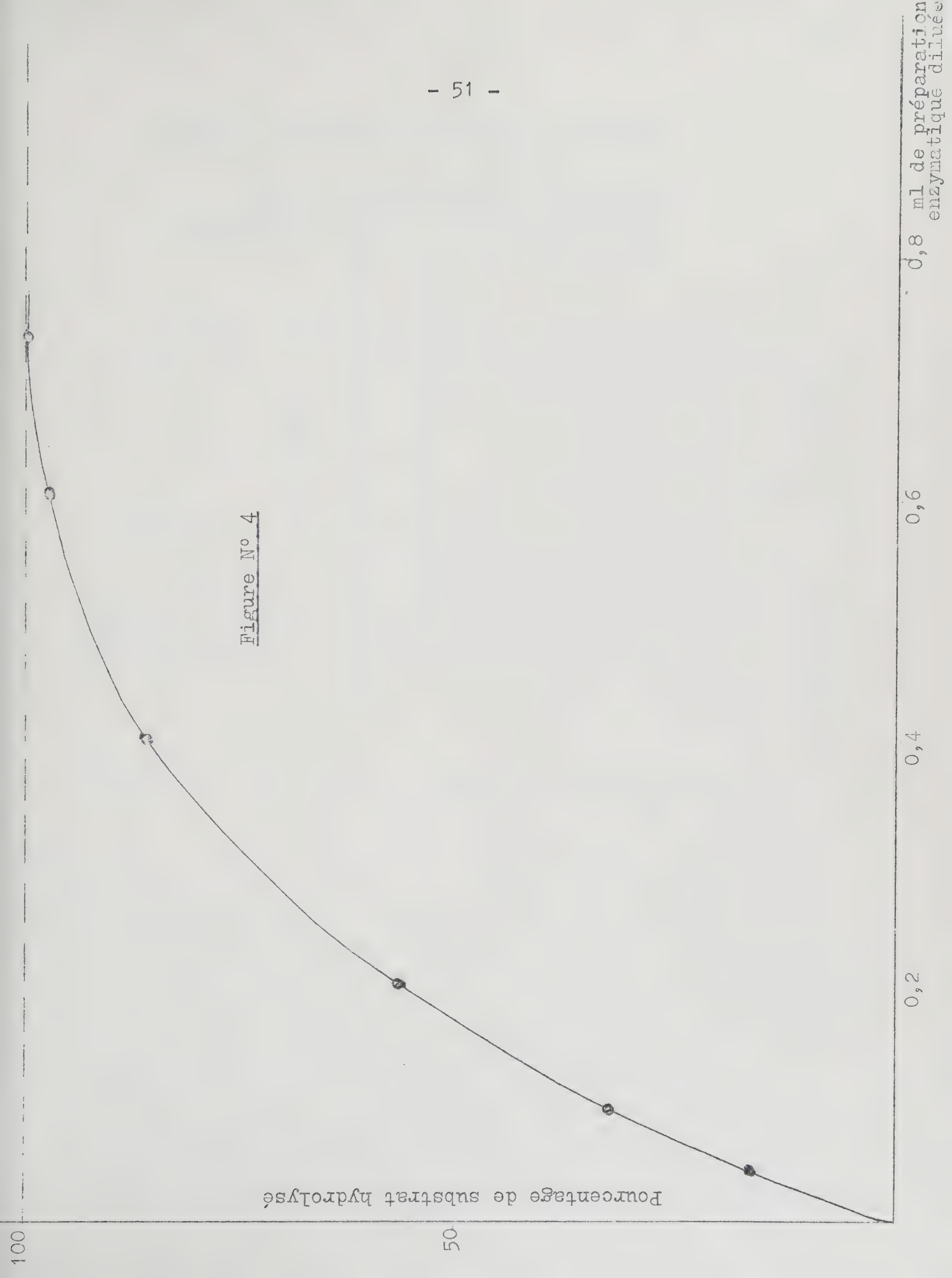
Figure N°3



4° - Hydrolyse du substrat en fonction de la quantité
d'enzyme

Cet essai a été effectué à pH 5,7 avec une concentration M/100 en tréhalose dans le milieu et en présence de quantités croissantes d'enzyme ; la figure 4 représente le pourcentage de substrat hydrolysé en fonction de la quantité d'enzyme.

Jusqu'à 50 % environ de substrat hydrolysé, la vitesse est proportionnelle à la quantité d'enzyme. La courbe s'infléchit ensuite et on obtient une hydrolyse totale du substrat pour une quantité déterminée d'enzyme. Cette hydrolyse totale montre qu'il n'y a pas réversibilité d'action, et l'aspect de la courbe 4 confirme qu'il n'y a pas lors de l'hydrolyse du substrat, libération d'un inhibiteur compétitif qui, en l'occurrence serait le glucose provenant du tréhalose.



5° - Hydrolyse de quantités variables de substrat
par des quantités identiques d'enzyme :
détermination de la constante de MICHAELIS

Nous avons opéré avec une concentration optimum en enzyme, déterminée lors des essais précédents, le pH du milieu était de 5,7 et la température de 37°C. Le substrat a été ajouté au milieu d'incubation de façon à obtenir des concentrations en tréhalose de M/20 à M/320 dans le milieu.

Avec ces données expérimentales, nous avons calculé la constante de MICHAELIS graphiquement selon la méthode de LINEWEAVER et BURK (45) (en construisant la courbe $\frac{1}{V}$ fonction de $\frac{1}{S}$) ; la droite que nous obtenons coupe l'axe des ordonnées au point :

$$\frac{1}{VM} \cdot 10^2 = 1,25$$

où VM = 80 micromoles.

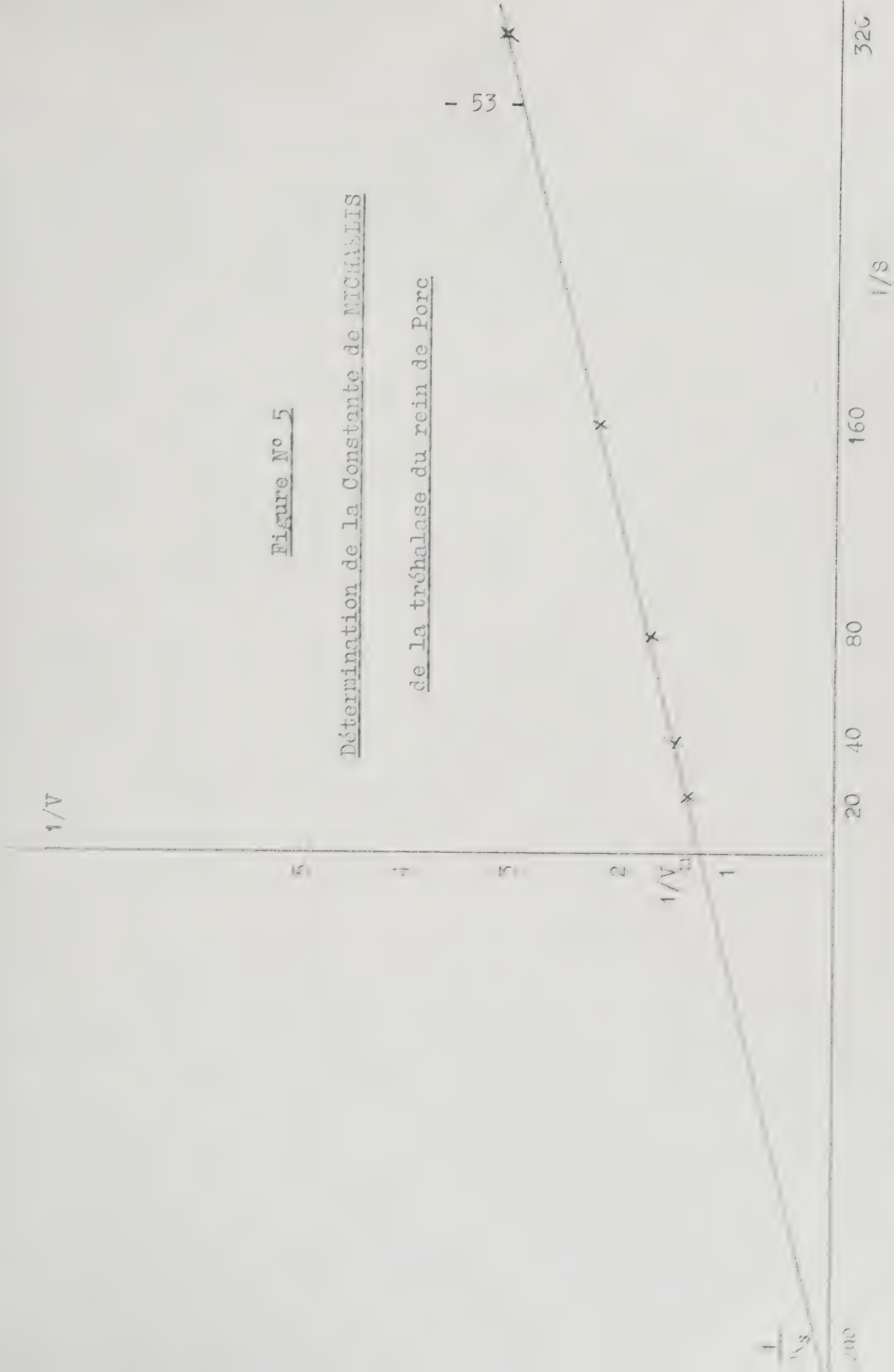
Ce résultat est bien en accord avec la vitesse maximum déterminée précédemment. La droite se prolonge alors et coupe l'axe des abscisses au point $-\frac{1}{KS} = -200$ d'où l'on tire la constante de MICHAELIS ; $K_S = 5 \cdot 10^{-3}$ (figure 5).

Toujours en fonction des mêmes résultats expérimentaux, nous avons tracé la courbe de V en fonction de $\frac{V}{S}$ où V représente la vitesse de la réaction et S la concentration en substrat. Cette représentation proposée par AUGUSTINSEN (2)

Figure No 5

Détermination de la Constante de MICHAELIS

de la tréhalase du rein de Porc



a le mérite d'après HOFSTEE (41) de mieux mettre en évidence la présence de deux ou plusieurs enzymes agissant simultanément et indépendamment sur le même substrat avec des constantes de réactions différentes. S'il n'existe qu'un enzyme la courbe est assimilable à une droite entre les coordonnées, dans le cas contraire, cette droite s'incurve plus ou moins à ses deux extrémités.

En effet, chaque point de la courbe, en présence de deux enzymes a pour coordonnées $\sum V$ et $\sum \frac{V}{S}$, la courbe résultante est alors la somme des deux courbes obtenues avec chacun des enzymes pris isolément.

La figure 6 représente la courbe V en fonction de $\frac{V}{S}$. Elle est rectiligne ce qui indique que la préparation ne contient qu'un enzyme hydrolysant le tréhalose. Cette droite coupe l'axe des ordonnées au point $VM = 80$ micromoles par minute et l'axe des abscisses au point $\frac{VM}{KS} = 16$

$$\text{d'où } K_S = \frac{0,08}{16} = 5 \cdot 10^{-3}$$

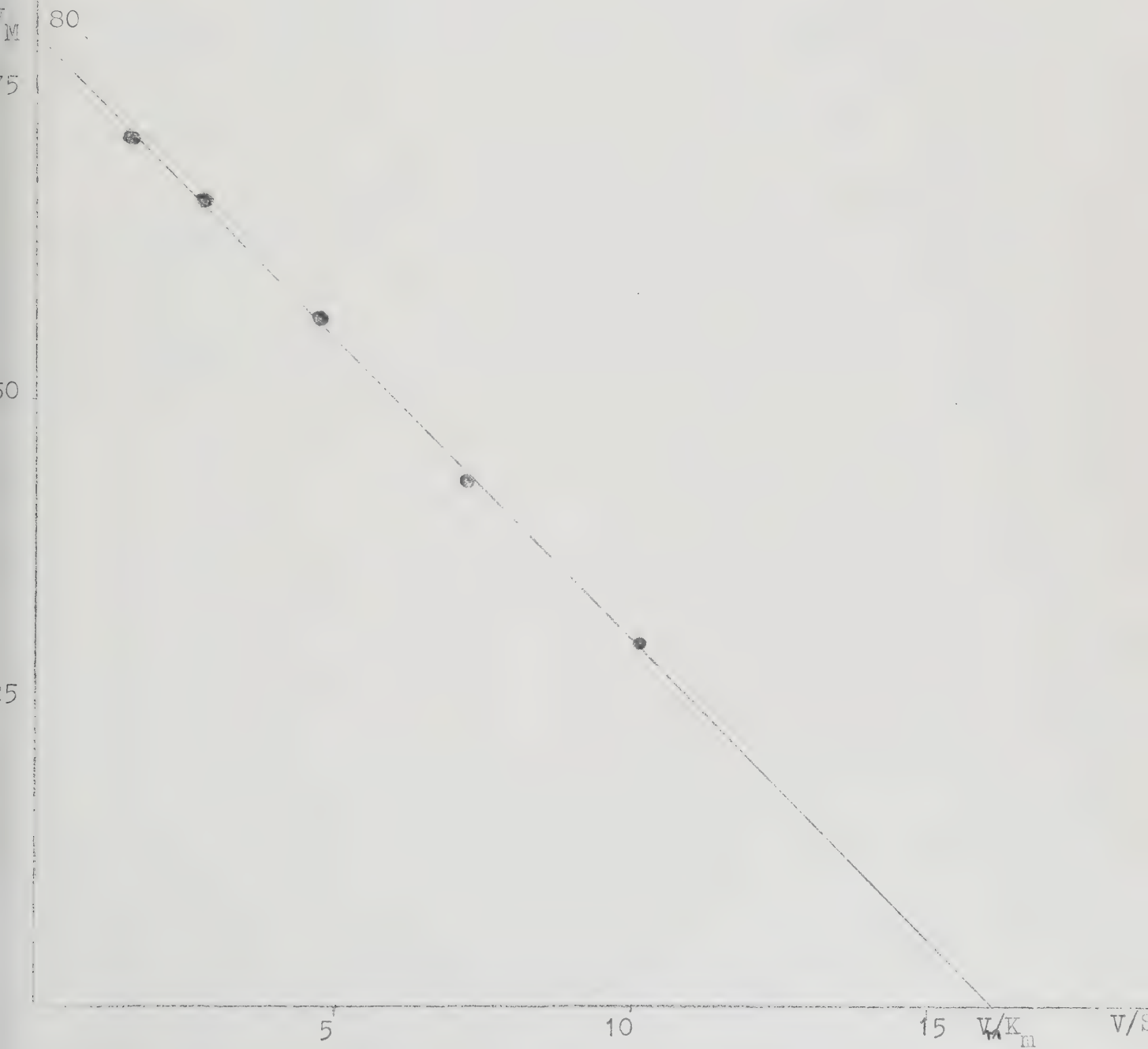
Ce mode de représentation confirme, en outre, les résultats obtenus par la méthode de LINEWEAVER et BURK utilisée pour déterminer la constante de MICHAELIS et la vitesse maximum.

V

Figure N° 6

Détermination de la Constante de MICHAELIS

de la tréhalase du rein de Porc



6° - Thermostabilité de l'enzyme

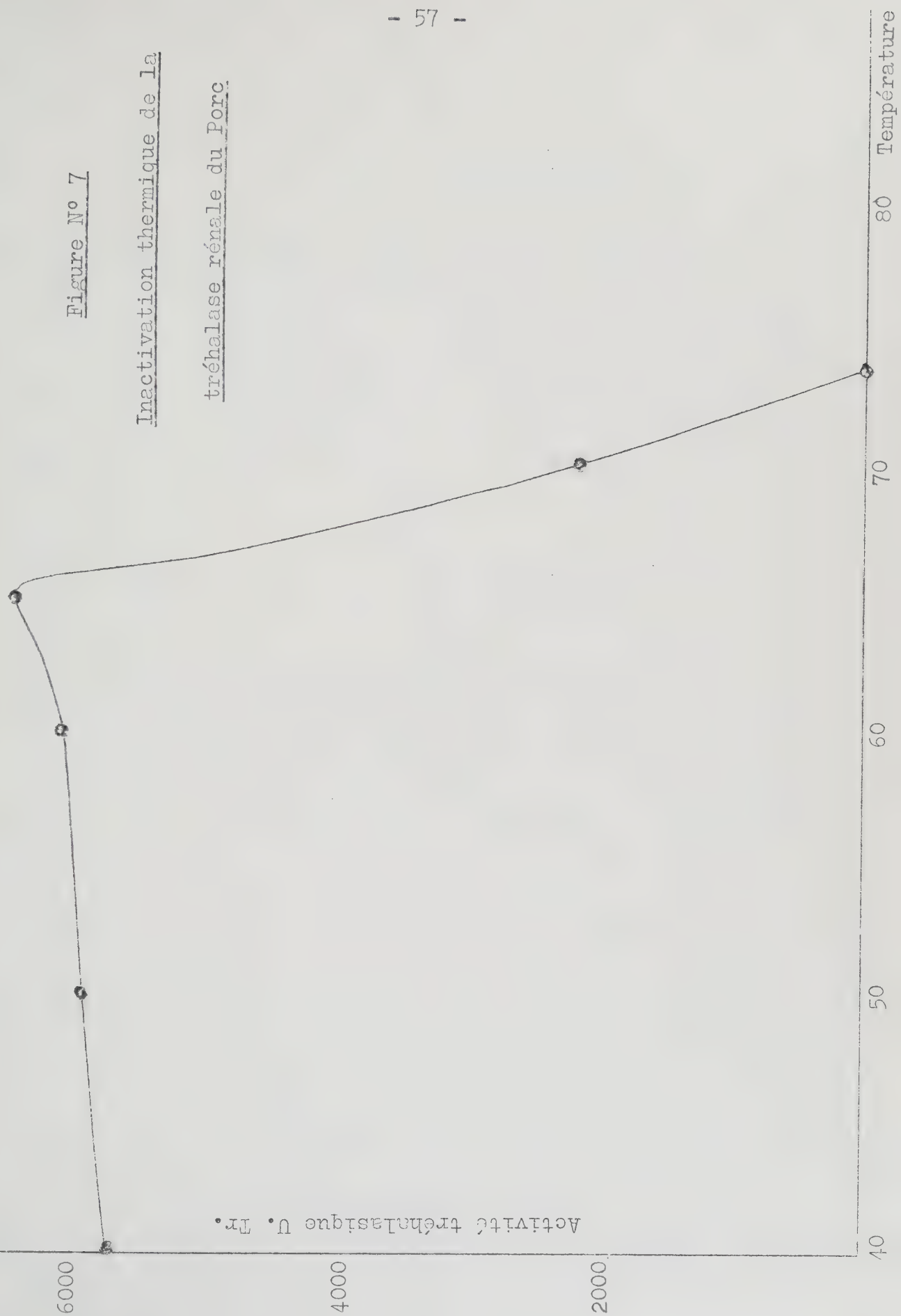
La solution d'enzyme est chauffée à la température que l'on désire étudier pendant 15 minutes, puis refroidie aussitôt. Si un précipité apparaît lors du chauffage nous l'éliminons par centrifugation ; chaque solution d'enzyme est alors mise en présence du substrat selon la technique habituelle.

L'enzyme demeure stable jusqu'à 65°. Après un plateau situé entre 40° et 60°, on note même une légère activation vers 65° ; au delà de 65°, l'inactivation de l'enzyme est très rapide et l'activité disparaît complètement vers 70° (figure 7). Il est possible que la légère activation notée vers 65° corresponde à la disparition d'un inhibiteur détruit à cette température.

Figure N° 7

Inactivation thermique de la

tréhalase rénale du Porc



B) - Rein d'Homme

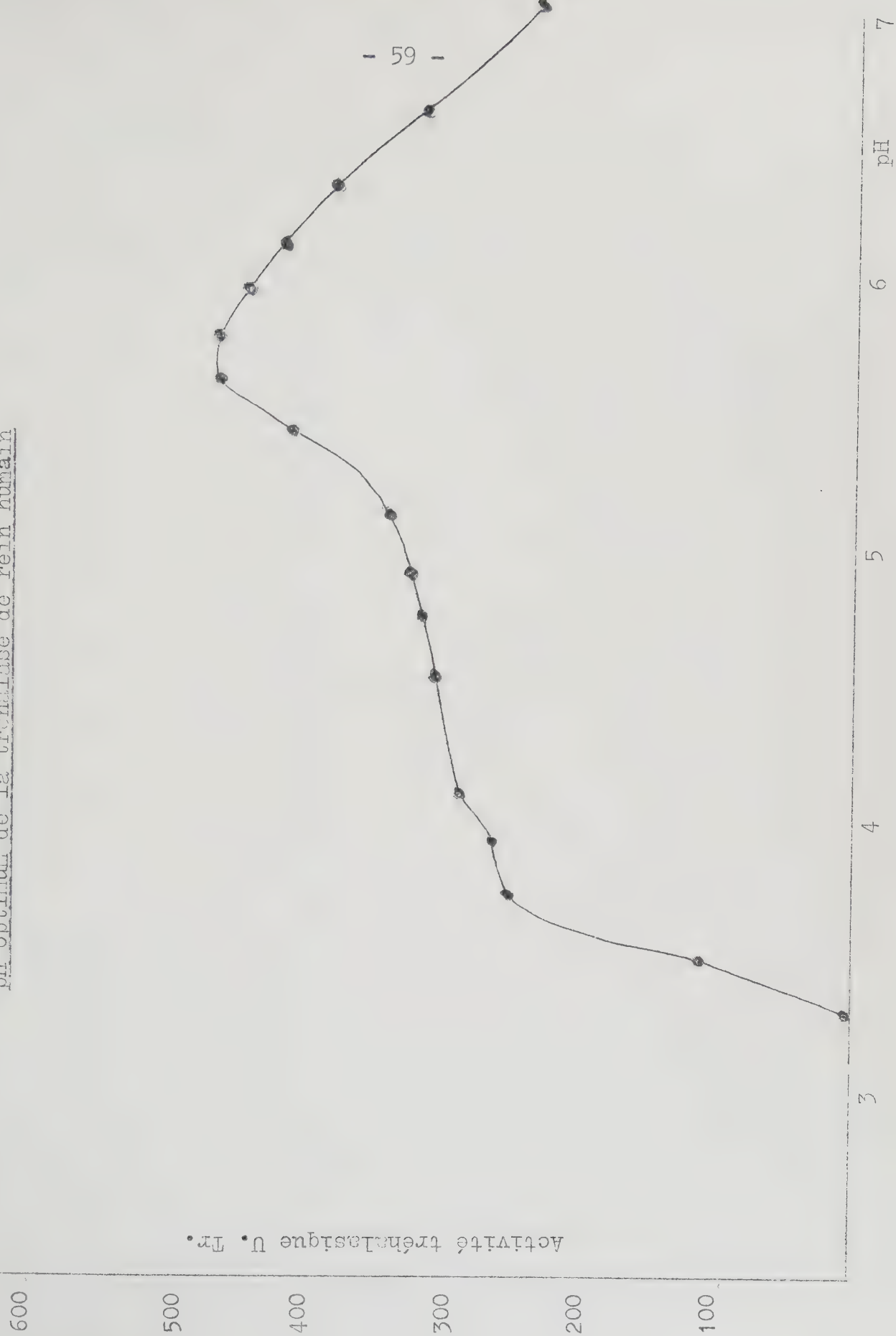
Nous avons utilisé, pour la purification de l'enzyme humain, le protocole opératoire établi avec les reins de Porc. Nous avons procédé ensuite de la même manière, à l'étude de la cinétique enzymatique de la tréhalase rénale humaine. Nous avons enfin groupé nos résultats sous forme de figures.

1° - pH optimum

La courbe de la figure 8 est très semblable à celle obtenue avec l'enzyme du Porc ; le pH optimum est d'ailleurs identique 5,7 - 5,8 et le comportement des deux enzymes en milieu acide et alcalin est similaire.

Figure N° 8

pH optimum de la tréhalase de rein humain



2° - Vitesse maximum et constante de MICHAELIS

La vitesse maximum déterminée et calculée selon différentes méthodes oscille entre 37 et 40 micromoles de tréhalose par minute avec des préparations d'enzymes provenant de reins différents. La constante de MICHAELIS calculée par la méthode de LINEWEAVER et par celle de AUGUSTINSEN est de $3 \cdot 10^{-3}$ et il n'apparaît pas qu'il y ait deux enzymes distincts agissant sur le tréhalose (figures 9 et 10).

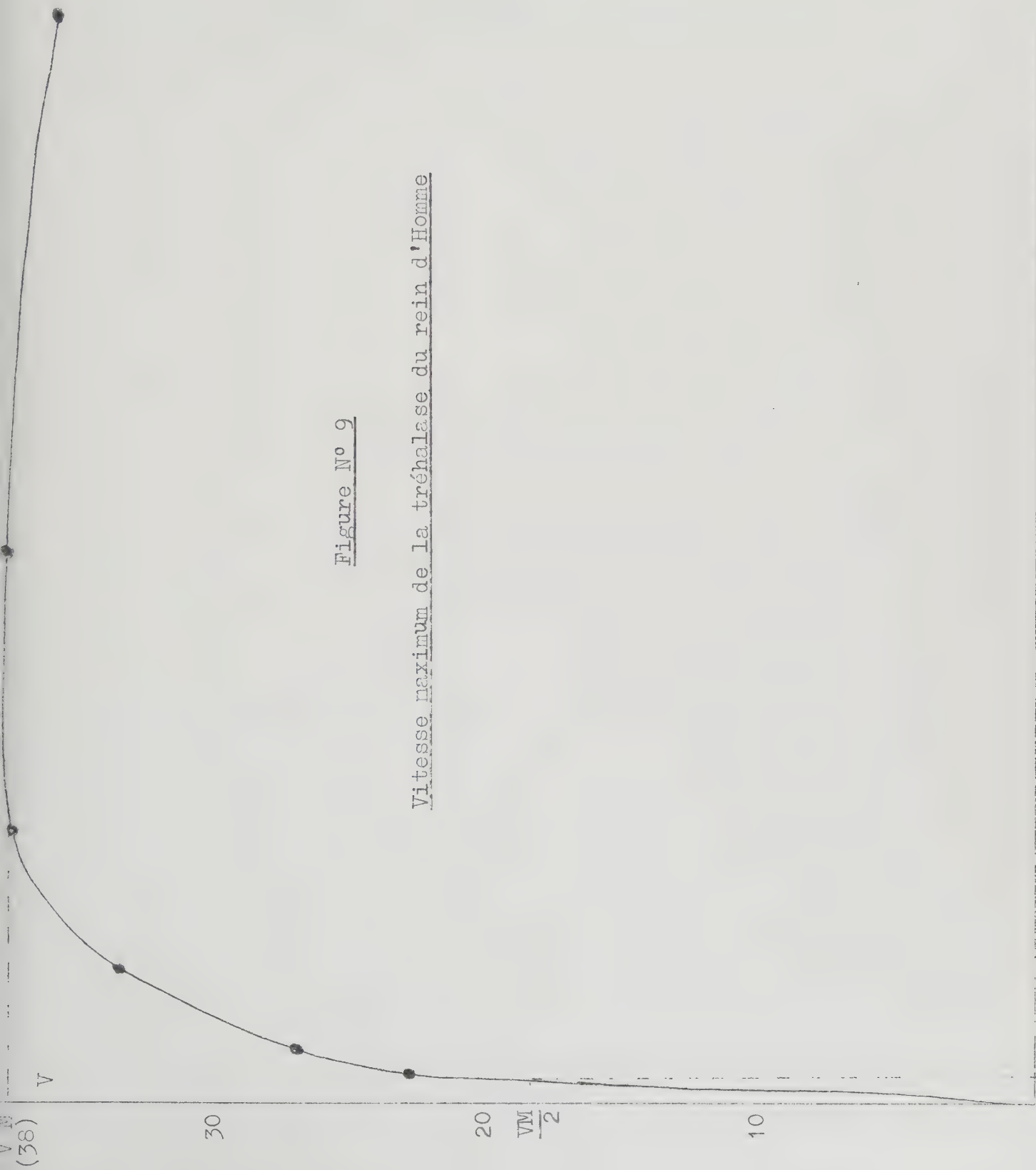


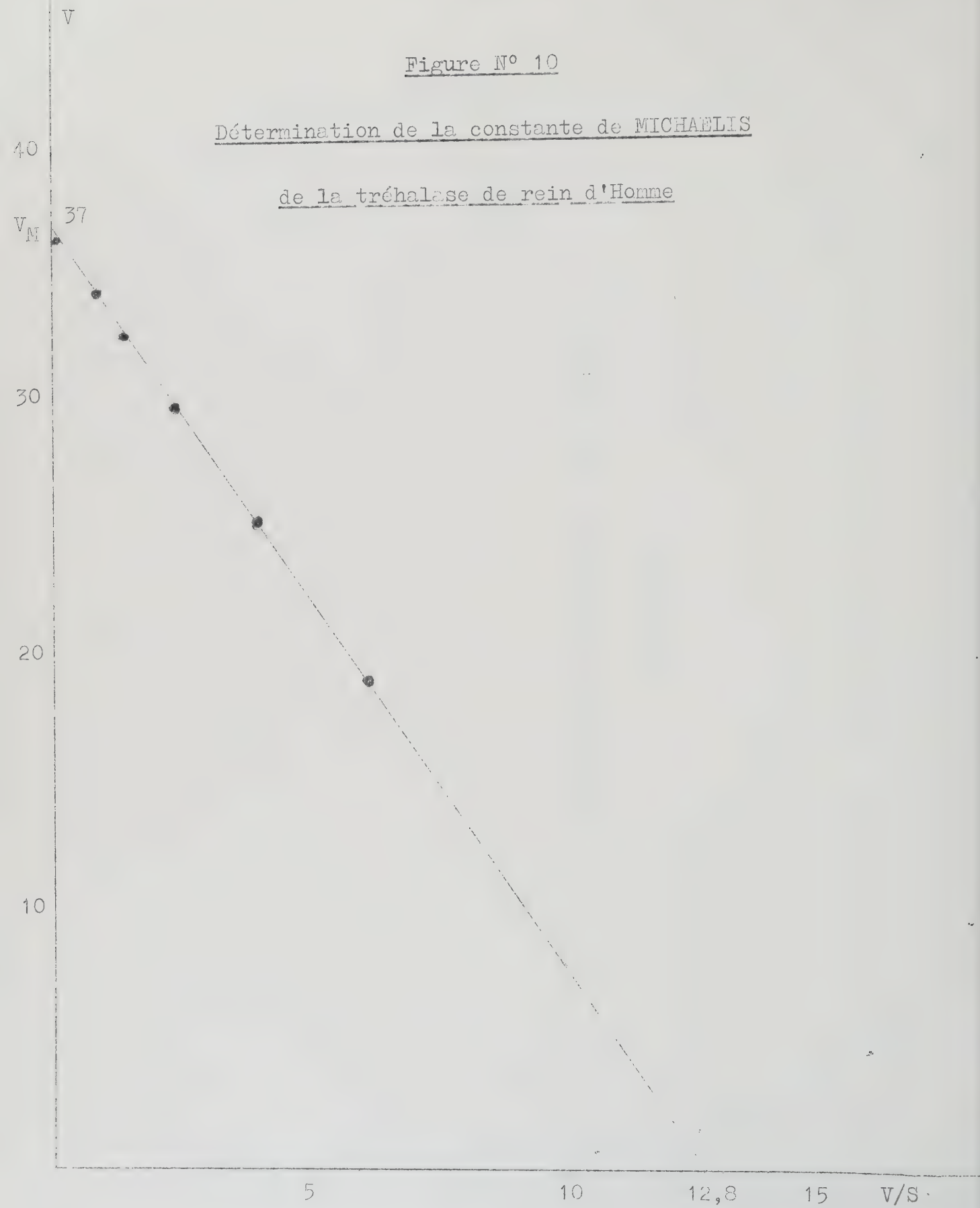
Figure N° 9

Vitesse maximum de la tréhalase du rein d'Homme

Figure N° 10

Détermination de la constante de MICHAELIS

de la tréhalase de rein d'Homme



Chapitre V - ACTION DE DIFFERENTS EFFECTEURS

Nous étudions dans ce chapitre l'action sur les tréhalases rénales de différents effecteurs choisis parmi des ions minéraux des oligosaccharides et des hétérosides. Cette étude a pour but de permettre une comparaison du comportement des tréhalases de différentes origines en présence de ces substances.

1°) - Action de divers ions minéraux

Tous les cations minéraux ont été employés sous forme de chlorures, sauf le cobalt qui était sous forme de nitrate et le nickel sous forme de sulfate. Les essais ont été effectués à pH 5,7 et 37° en présence de tréhalose 0,01M dans le milieu ; trois concentrations différentes d'effecteurs ont été étudiées : nous avons en effet opéré avec les concentrations 0,01, 0,002 et 0,001 M en cation dans le milieu. Nous n'avons ainsi observé aucune action avec le potassium, le calcium, le magnésium, le zinc, le nickel et le cobalt.

L'emploi des cations sous forme de sels permet de constater que les ions chlorures, sulfates et nitrates n'ont pas non plus d'influence sur les tréhalases du rein d'Homme et de Porc.

Nous avons étudié à part et avec un intérêt particulier, l'ion sodium. Ce cation en effet possède la propriété d'activer la sucrase et à un moindre degré, les maltases intestinales ; SEMENZA et coll. (6) (59). D'autre part, les observations tendent à montrer que les disaccharidases intestinales sont en rapport avec le transfert des ions sodium de la pompe à sodium. Nous avons dialysé notre préparation enzymatique de façon à éliminer totalement le sodium qu'elle pouvait contenir. Le tampon acide acétique soude que nous utilisons habituellement a été remplacé par un tampon acide phosphorique hydroxyde de lithium (M/l) de même pH ; les concentrations du sodium utilisé étaient de 0,01, 0,002 et 0,001 dans le milieu ; nous n'avons observé dans ces conditions aucune action du sodium sur le comportement de l'enzyme.

Nous rattacherons à l'étude de ces cations deux autres substances que nous avons étudiées ; il s'agit de l'ouabaïne qui possède la propriété d'inhiber la pompe à sodium ; celle-ci est demeurée sans action sur les tréhalases rénales à des concentrations variant de 0,0031 à 0,05 M dans le milieu. L'autre substance est l'acide p.chloromercuribenzoïque qui possède la propriété d'inhiber la tréhalase purifiée de Hanneton (23) ; elle est restée sans action sur les tréhalases rénales à la concentration de $7 \cdot 10^{-3}$ M dans le milieu.

2°) - Action de divers oses et oligosaccharides

Ces essais furent réalisés avec une concentration en tréhalose M/100 dans le milieu. Les corps étudiés dont nous cherchions une éventuelle influence sur les tréhalases des reins de Porc et d'Homme étaient également à cette concentration.

Nous n'avons observé aucune activation ou inhibition avec le D-glucose, le D-glucitol, le D-gluconate de potassium, le raffinose et le mélézitose.

L'érythritol qui inhibe de nombreuses glycosidases est resté sans action sur les tréhalases rénales.

Seul le saccharose a exercé une forte action inhibitrice sur les tréhalases rénales de l'Homme et du Porc. Cette action inhibitrice croît avec la concentration moléculaire de l'inhibiteur dans le milieu. Les concentrations que nous avons utilisées étaient de 0,0031, 0,0062, 0,0125, 0,025 et 0,05 M dans le milieu. Les résultats que nous avons obtenus sont représentés sur la figure 11. Le saccharose inhibe de façon à peu près identique les tréhalases des reins de Porc et d'Homme. Par contre, deux trisaccharides dérivant du saccharose, le raffinose α galactoside du saccharose et le mélézitose α glucoside du saccharose, n'ont pas provoqué d'inhibition. Il semble que l'accroissement de la taille de la molécule fasse disparaître le pouvoir inhibiteur ; à l'inverse, des oses de poids moléculaire plus faible que le saccharose n'exercent pas d'inhibition : ainsi le glucose n'a pas inhibé ces enzymes. Il semble donc que le saccharose possède une structure qui lui permette de se combiner avec l'enzyme et

Figure N° 11

Rein de Porc

100

Pourcentage de substrat hydrolysé

50



M/40

M/320 M/160 M/80

Rein d'Homme

66



M/40

M/20 M/320 M/160 M/80

Saccharose

M/20

d'inhiber l'hydrolyse du tréhalose ; nous verrons plus en détails les caractéristiques de cette inhibition dans un chapitre ultérieur.

3°) - Action de différents hétérosides

La mise en évidence d'une action inhibitrice du phloridzozide sur la tréhalase du sérum nous a amené à étudier le comportement des tréhalases rénales vis-à-vis de cet hétéroside. En présence de quantités croissantes de phloridzozide, on obtient avec les reins de Porc et d'Homme une forte inhibition de l'activité tréhalasique. Cette inhibition augmente lentement avec la concentration de l'effecteur. Nos résultats sont groupés sur la figure 12.

Cette inhibition importante nous a conduit à étudier d'autres hétérosides de structure voisine. Ils possèdent une aglycone dérivant des chalcones comme le phloridzozide, ou de flavanones qui diffèrent de la structure des chalcones par élimination de deux atomes d'hydrogène et cyclisation. La structure des dihydro-chalcones et des flavanones est représentée sur les figures 13 et 14 où nous indiquons les formules des différents hétérosides obtenus en fonction des substitutions des hydrogènes en R, R' et R". Le tableau XIV résume les résultats des inhibitions que nous avons obtenus avec les dérivés des dihydro-chalcones et des flavanones.

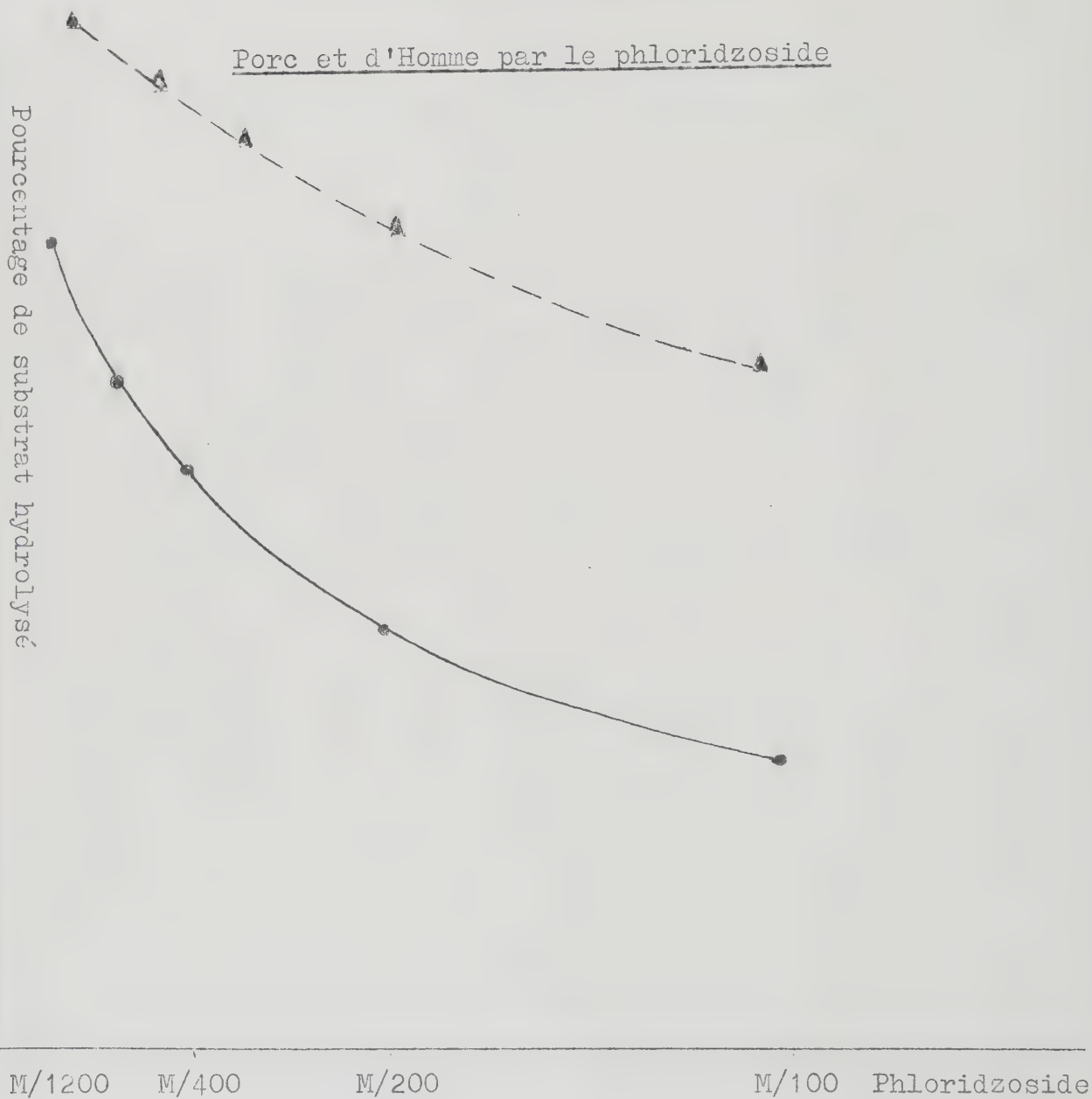
Tous les hétérosides étudiés étaient, quand leur solubilité le permettait à la concentration de M/100 dans le milieu,

Figure N° 12

Inhibition des tréhalases de

Porc et d'Homme par le phloridzose

Pourcentage de substrat hydrolysé

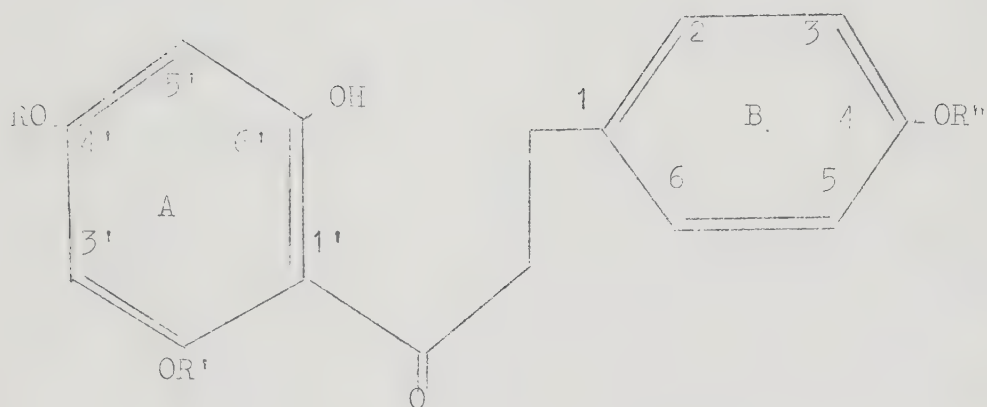


▲ — — — — — ▲ Rein d'Homme

● — — — — — ● Rein de Porc

Figure N° 13

Dihydro-Chalcones



- Phlorétol

R	H
R'	H
R''	H

- Phloridzoxide

R	H
R'	β glc
R''	H

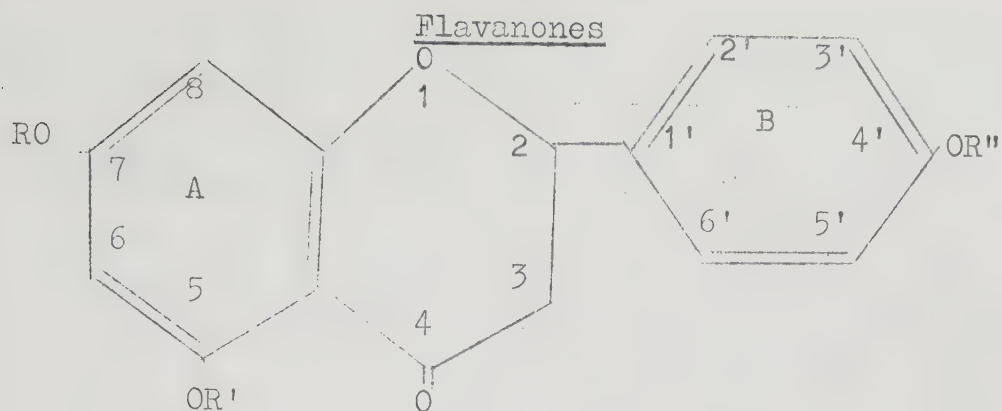
- 4-méthyl-para-phloridzoxide

R	β glc
R'	H
R''	CH ₃

dans les autres cas, la concentration du corps étudié est précisée dans les tableaux.

Nous indiquons dans nos formules la numérotation préconisée par la nomenclature. Celle-ci étant peu pratique pour comparer la structure des hétérosides dérivant des chalcones et des flavanones, nous avons appelé R, R' et R" les substitutions effectuées sur les hydroxyles correspondants. Dans les chalcones, les carbones du cycle B, le plus proche de la double liaison, sont numérotés de 1 à 6 alors que dans le cycle A le plus éloigné, les carbones sont numérotés de 1' à 6' ; par contre dans les flavanones le cycle B se trouve à l'état de substituant et ses carbones sont de ce fait numérotés de 1' à 6'.

Figure N° 14



- Naringétol

R	H
R'	H
R''	H

- Naringoside

R	α rhamnosido-1-2-D-glucosyl
R'	H
R''	H

- Salipurposide

R	H
R'	β glc
R''	H

- Sakuramine

R	CH_3
R'	β^3 glc
R''	H

- Sakuranétine

4' glucoside

R	CH_3
R'	H
R''	β glc

- Sakuranétine

diglucoside

R	CH_3
R'	Glc
R''	Glc

- Isosakuranétine

diglucoside

R	Glc
R'	Glc
R''	CH_3

T A B L E A U N ° XIV

Inhibition des tréhalases rénales du Porc et de l'Homme

par des dérivés des chalcones et des flavanones

Hétérosides ou aglycones	Concentration dans le milieu	Porc	Homme
Phlorétol	0,00014 M	41 *	25
Phloridzozide	0,005 M	55	22
	0,01 M	79	43
Naringétol	0,00014 M	37	0
Naringozide	0,01 M	0	0
Salipurposide	0,005 M	36	21

* Les chiffres du tableau correspondent au pourcentage d'inhibition.

Les hétérosides ne figurant pas dans ce tableau n'ont pas inhibé l'activité enzymatique des tréhalases rénales.

L'étude de ce tableau montre que dans le groupe de chalcones, le phlorétol, aglycone correspondant au phloridzozide possède une action inhibitrice environ 50 fois supérieure

à celle du phloridzose sur les tréhalases rénales de l'Homme et du Porc. Le phlorétol a été en effet employé pour l'étude de cette inhibition et compte tenu de sa faible solubilité, à une concentration de 0,00014 M dans le milieu. Cette concentration correspond à une solution saturée en phlorétol à 37° et à pH 6 ; nous l'avons déterminée par étude de l'absorption de la solution à 290 nanomètres en comparaison avec des solutions témoins de phlorétol dans l'alcool absolu.

Dans le groupe des flavanones, on remarque en ce qui concerne le rein de Porc, d'une part que le naringétol employé comme le phlorétol à la concentration de 0,00014 M est cinquante fois plus inhibiteur que le salipurposide où l'aglycone est osidifiée par une molécule de β glucose et que, d'autre part le naringoside, qui est osidifié par le néohespéridose, α L rhamnosido-1-2-D-glucose, n'est plus inhibiteur. Il semble donc que la liaison de l'hydroxyle phénolique à des oses ou à du méthanol, diminue l'inhibition en augmentant la taille de la molécule. L'absence d'inhibition dans ce groupe par le naringoside, la sakuranine, la sakuranétine 4' glucoside, la sakuranétine diglucoside et l'isosakuranétine montre que le poids et la taille moléculaire du salipurposide représentent le poids et la taille moléculaire maximums parmi les dérivés étudiés permettant une inhibition des tréhalases rénales.

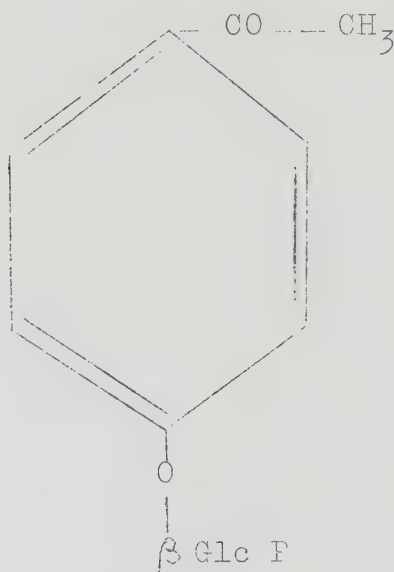
Contrairement à ce que nous avons obtenu avec les tréhalases du rein de Porc, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'inhibition de la tréhalase rénale de l'Homme par le naringétol bien que l'enzyme soit inhibé mais d'une façon moins

importante que celui du rein de Porc par le salipurposide.

Ces résultats nous ont incité à expérimenter d'autres hétérosides ; nous n'avons noté aucune inhibition avec le primevéroside où le primevérose osidifie l'ester méthylique de l'acide oxy-2-méthoxy-4-benzoïque, ni avec le salicoside dont l'aglycone est à noyau benzénique ; l'isoamyl- β -glucoside et le méthyl- α -glycoside sont restés eux aussi sans effet.

La seule inhibition observée est celle obtenue avec le picéoside ou β glucoside de la paraoxyacétophénone (figure 15).

Figure N° 15



PICEOSIDE

(p. oxyacétophénone β glucoside)

Cette inhibition nous a amené à étudier l'acétophénone, le β phénylglucoside et le paranitrophényl β glucoside. Nos résultats sont groupés dans le tableau XV. L'inhibition obtenue avec le picéoside est beaucoup plus faible que celle obtenue avec le phloridzосide et le salipurposide ; l'acétophénone n'a pas provoqué d'inhibition ; le phényl β glucoside, au contraire, est assez nettement inhibiteur de la tréhalase du rein de Porc.

T A B L E A U N ° XV

Inhibition des tréhalases rénales par quelques β glucosides

Hétérosides	Concentration dans le milieu	Porc	Homme
Picéoside	0,005 M	6*	6
	0,01 M	18	17
Phényl β glucoside	0,01 M	19	2
P. nitrophényl β glucoside	0,01 M	42,5	34

* Les chiffres du tableau représentent les pourcentages d'inhibition.

Quant au paranitrophénylglucoside, il est très inhibiteur mais cette inhibition est vraisemblablement sans spécificité. Le groupement NO_2 fixé sur un noyau benzénique confère à ce corps une forte activité inhibitrice ; c'est ainsi que l' α galactosidase de *Vicia Sativa*, PETEK et coll. (51), hydrolyse le p. nitrophényl-galactoside employé à faible concentration, mais elle est fortement inhibée par un excès de ce substrat. Cette inhibition n'est pas retrouvée avec d'autres substrats comme le phényl α D-galactoside, le raffinose et la galactinol.

La présence d'un groupement carbonyle dans la formule des trois hétérosides possédant une activité inhibitrice nous a amené à étudier l'acétone à la concentration de M/100 dans le milieu ; celle-ci est restée sans effet ; l'acétophénone n'avait pas non plus, nous l'avons vu, inhibé les tréhalases rénales.

Chapitre VI - ETUDE DE L'INHIBITION DE LA TREHALASE DU REIN
D'HOMME ET DE PORC PAR LE SACCHAROSE, LE
PHLORIDZOSIDE ET LE PHLORETOL

Pour étudier le comportement des tréhalases en présence de ces effecteurs, nous avons effectué des déterminations d'activité enzymatique en maintenant l'inhibiteur à une concentration constante et en faisant varier les concentrations en substrat. Toutes les déterminations ont été effectuées à 37° et à pH 5,7.

A partir de ces données expérimentales, nous avons tracé sur un même graphique la représentation selon LINEWEAVER et BURK de $\frac{1}{V}$ en fonction de $\frac{1}{S}$ en présence et en absence d'effecteur.

Nous avons ensuite calculé la constante de dissociation du composé enzyme-inhibiteur K I. Pour cela nous avons appliqué les formules suivantes :

- 1) Lorsque l'inhibition est du type compétitif

$$K I = \frac{i}{\frac{K_p}{K_m} - 1} \quad (I)$$

ou i représente la concentration en inhibiteur dans le milieu, exprimée en moles,

K_p, la constante de dissociation du composé enzyme substrat en présence de l'inhibiteur,

K_m , la constante de MICHAELIS.

2) Lorsque l'inhibition est du type non compétitif.

$$K I = \frac{i}{\frac{V_p}{V_m} - 1} \quad (II)$$

ou V_p représente la vitesse maximum en présence d'inhibiteur.

V_m , la vitesse maximum de la réaction.

I) - Tréhalase du rein de Porc

1° - Inhibition par le saccharose

La concentration en inhibiteur était de 0,025 M dans le milieu. Nos résultats sont groupés dans le tableau XVI et la représentation de ces résultats selon la méthode de LINEWEAVER et BURK fait l'objet de la figure 16. La diminution de l'inhibition lorsque la concentration en tréhalose augmente ainsi que l'allure de la courbe de la figure 16 montrent que le saccharose se comporte vis-à-vis de la tréhalase rénale du Porc, comme un inhibiteur compétitif. La constante de dissociation du composé enzyme inhibiteur calculée selon la formule I est égale à :

$$K I = 10,8 \cdot 10^{-5}.$$

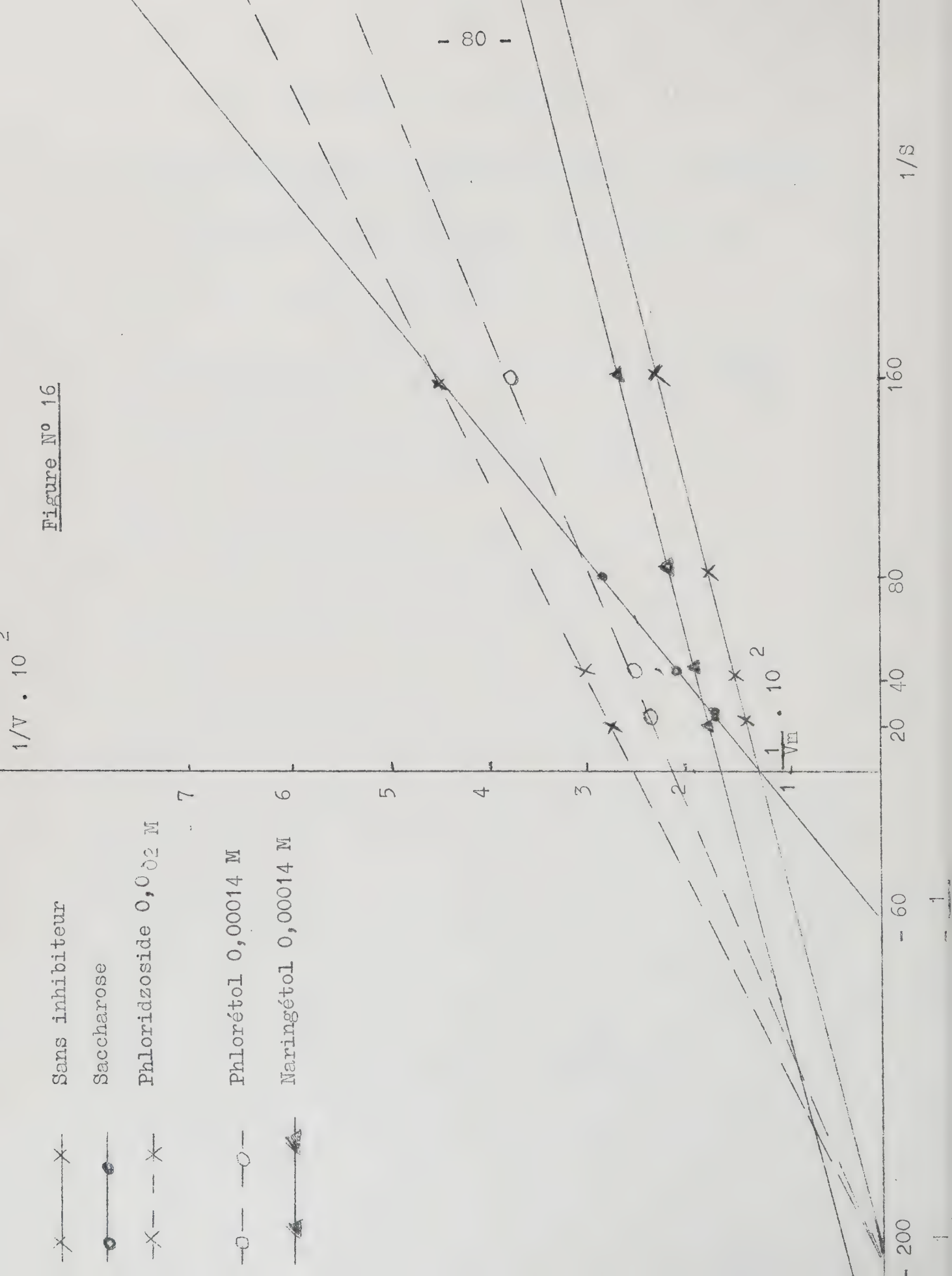
T A B L E A U N ° XVI

Inhibition de la tréhalase rénale par le saccharose M/40

en fonction de la concentration en tréhalose

Concentration moléculaire en tréhalose : dans le milieu	Homme n° I	Homme n° II	Porc
0,00312	68*	71	58
0,00625	60	60	
0,0125	46	51	40
0,025	31	34	30
0,05	23	20	18

* Les nombres du tableau indiquent les pourcentages
d'inhibition à pH 5,7 et 37°.



2° - Inhibition par le phloridzozide

Nous avons étudié l'influence du phloridzozide à la concentration de 0,002 M dans le milieu sur l'activité tréhalasique de deux préparations distinctes provenant de deux reins différents. Les résultats sont groupés dans le tableau XVII et font l'objet de la figure 16; ils montrent que le phloridzozide se comporte comme un inhibiteur du type non compétitif; en effet le pourcentage d'inhibition est indépendant de la concentration en substrat et la présence de l'inhibiteur fait décroître la vitesse maximum de la réaction sans en affecter la constante de Michaelis; la figure 16 montre également que cette vitesse maximum diminue l'orsque la quantité d'inhibiteur augmente. Le calcul de la constante de dissociation du composé enzyme-inhibiteur selon la formule II donne:

$$K I = 10 \cdot 10^{-3} .$$

3° - Inhibition par le phlorétol et le naringétol

Le phlorétol était à la concentration de 0,00014 M. L'inhibition est exactement du même type que celle observée avec le phloridzozide et le $K I$ égal à $0,21 \cdot 10^{-3}$.

Le naringétol à la concentration de 0,00014 M dans le milieu d'incubation provoque une inhibition du même ordre de grandeur que le phlorétol, mais elle est du type incompétitif et en représentant $1/V$ en fonction de $1/S$, on obtient une droite parallèle à celle que l'on obtient en absence

d'inhibiteur ; il y a diminution simultanée de la vitesse maximum et de la constante de MICHAELIS.

T A B L E A U N ° LVII

Inhibition des tréhalases rénales par le phloridzoside
en fonction de la concentration en tréhalose

Concentration moléculaire en tréhalose dans le milieu	Homme N° 1	Homme N° 2	Porc et Phloridzoside 0,002 M	
	Phloridzoside 0,01 M	Phloridzoside 0,002 M	1 ^{er} échantillon	2 ^e échantillon
0,00312	60*	34	49	60
0,00625	50	27	46	62
0,0125	40	15		61
0,025	28	10	52	57
0,05	22	2	47	59

* Les nombres du tableau indiquent les pourcentages
d'inhibition à pH 5,7 et 37°.

II) - Tréhalase du rein d'Homme

1° - Inhibition par le saccharose

Nous avons procédé comme pour le rein de Porc. L'inhibition est du même type, c'est-à-dire compétitif et le calcul du K I donne une valeur égale à $6 \cdot 10^{-3}$ du même ordre de grandeur que celle obtenue avec le rein de Porc. Nos résultats sont groupés dans le tableau XVI et la figure 17.

2° - Inhibition par le phloridzoside

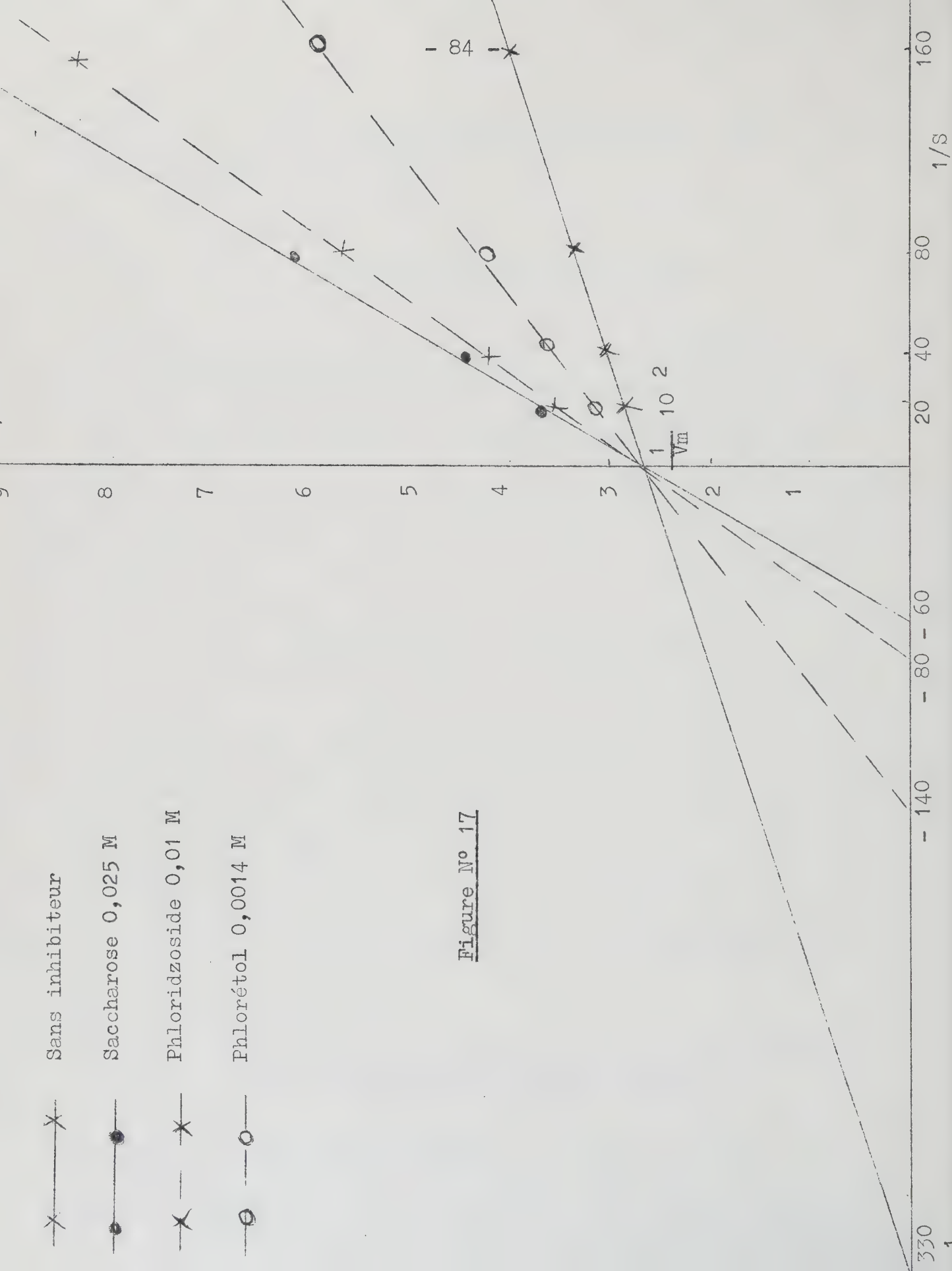
Nous avons procédé là encore, comme pour le rein de Porc. Mais l'étude du tableau XVII et de la figure 17 montre que l'inhibition est du type compétitif, contrairement à celle observée à partir du rein de Porc. L'observation du tableau XVII montre en effet que l'inhibition varie en fonction de la concentration en substrat. Le calcul du K I donne une valeur de $4 \cdot 10^{-3}$.

3° - Inhibition par le phlorétol

Elle est identique à celle obtenue avec le phloridzoside c'est-à-dire qu'elle est compétitive ; mais elle est beaucoup plus intense comme l'indique son K I qui est de $0,1 \cdot 10^{-3}$.

$\times$ — $\times$ — Sans inhibiteur
 $\bullet$ — $\bullet$ — Saccharose 0,025 M
 $\times$ — $\times$ — Phloridzide 0,01 M
 $\circ$ — $\circ$ — Phlorétol 0,0014 M

Figure N° 17



En résumé, parmi tous les oses et oligosaccharides étudiés, seul le saccharose de structure proche du tréhalose a inhibé les tréhalases rénales du Porc et de l'Homme. L'inhibition est de même intensité et compétitive dans les deux cas. Nous n'avons pas observé d'inhibition avec des oses de poids moléculaire inférieur à celui du saccharose tel que le glucose ; l'étude de la cinétique de la réaction l'avait d'ailleurs déjà laissé prévoir ; absence d'inhibition également avec des saccharides dont l'encombrement moléculaire semble être incompatible, parce que trop important, avec une fixation de ces substances sur le centre actif de l'enzyme ; c'est le cas des trisaccharides dérivant du saccharose, tels le raffinose et le mélézitose.

Le phloridzoside et son aglycone, le phlorétol inhibent fortement la tréhalase du rein de Porc, un peu moins la tréhalase du rein humain, mais si l'inhibition est du type compétitif, avec cette dernière elle n'est pas compétitive avec l'enzyme du rein de Porc.

Enfin le naringoside n'a inhibé aucune des deux tréhalases rénales, par contre, son aglycone, le naringétol qui est sans action sur l'enzyme du rein humain a inhibé assez fortement la tréhalase du rein de Porc ; cette inhibition est du type incompétitif.

Ce sont les deux seuls cas, mis en évidence, où il existe une différence entre les tréhalases rénales du Porc et de l'Homme qui semblent posséder par ailleurs, des comportements très semblables.

DISCUSSION GÉNÉRALE

—o—

Nous avons vu, dans l'introduction de ce travail, que la tréhalase était un enzyme extrêmement répandu chez les êtres vivants. Partout où le tréhalose a été identifié on a pu mettre en évidence un enzyme possédant une activité tréhalasique. Le tréhalose est lui-même un des disaccharides les plus répandus ; il a été caractérisé chez un grand nombre d'espèces végétales ou animales. On ne l'avait, cependant, jamais mis en évidence chez les Mammifères ; ce n'est que tout récemment qu'il a été identifié en faible quantité dans le rein de Lapin par SACKTOR (56). Ce fait nouveau va vraisemblablement permettre de retrouver ce glucide chez d'autres Mammifères et d'apporter une explication à l'importante activité tréhalasique localisée dans leur sang, leur rein et leur foie.

Nous avons montré que parmi tous les organes humains étudiés, seuls l'intestin, le rein et le foie possédaient une tréhalase qui pouvait être à l'origine de la tréhalase sérique. L'enzyme semble en effet exister régulièrement à un taux important dans le sérum de tous les individus (15) (21) (36).

La tréhalase sérique augmente assez régulièrement depuis la naissance pour atteindre le taux de l'adulte vers 7 à 10 ans. On note alors une grande dispersion des résultats chez les sujets normaux. Parmi les différentes affections

étudiées (36) (47) nous avons observé un net abaissement de l'activité tréhalasique sérique dans les cirrhoses décompensées et une constante augmentation dans les affections accompagnées d'une obstruction des voies biliaires principales provoquant une cholestase.

Ces faits montrent que la tréhalase sérique est en partie d'origine hépatique et qu'il existe une élimination biliaire de l'enzyme.

Il est possible toutefois que le rein, riche en tréhalase, déverse une partie de celle-ci dans le sang. L'étude des sujets binéphrectomisés montre avec certitude que la totalité de l'enzyme n'est pas d'origine rénale. Il persiste en effet chez ces sujets une nette activité tréhalasique dans leur sérum longtemps après l'ablation de leurs deux reins. Quant à l'activité enzymatique retrouvée dans l'urine il semble, comme le montrent les travaux effectués en collaboration avec Madame BARK, travaux non publiés, qu'elle ne provienne pas d'une filtration glomérulaire de l'enzyme sérique mais d'une desquamation des tubules rénaux.

SACKTOR a en effet montré par histochimie, la localisation tubulaire de l'enzyme dans le cortex rénal. L'étude de la clearance rénale de l'enzyme est en contradiction avec une excrétion de l'enzyme sérique par le rein. La faible activité retrouvée dans les urines semble donc provenir d'une libération de l'enzyme par les cellules rénales dans la lumière des tubules rénaux.

Nous avons retrouvé d'une façon constante la forte

activité tréhalasique sérique du sujet Martiniquais diabétique découvert par GEORGET en 1962 (16). Nous n'avons pu que constater la constance de cette augmentation sans pouvoir lui apporter une explication.

La répartition de l'enzyme chez les Mammifères appelle un certain nombre de remarques : tous les animaux que nous avons étudiés possèdent une tréhalase dont la répartition dans leur organisme est identique à celle que nous avons trouvée chez l'Homme.

D'autres travaux d'ailleurs, confirment que l'enzyme est très répandu chez les Mammifères (12) (16) (26) (34) (35) (47). Deux espèces font exception, le Rat et le Chat. Les Rats blancs d'élevage et les Rats noirs sauvages sont en effet dépourvus de tréhalase si on excepte une très légère activité tréhalasique du sérum des rats blancs d'élevage. Ces résultats confirment ceux qu'ont obtenus DAHLQVIST et BRUN (31) par histochimie et ceux de LUKOMSKAJA et TARASOVA (47). Nous avons mis régulièrement en évidence une forte activité tréhalasique dans le rein du Chat et nous sommes sur ce point, en désaccord avec les travaux de VAN HANDEL (60) qui n'a pas pu mettre en évidence une tréhalase rénale chez cet animal. Il est possible que nos recherches respectives aient été effectuées sur des Chats de races différentes, ce qui expliquerait les discordances de nos résultats. Les Chats que nous avons étudiés possèdent une faible activité tréhalasique sérique, d'ailleurs en rapport avec la faible activité hépatique que nous avons mise en évidence chez ces animaux. Les résultats obtenus avec les Chats orientent encore vers une origine hépatique de l'enzyme ce que confirme d'ailleurs

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus chez les Mammifères ; ils montrent également que chez une même espèce il existe d'assez nettes différences entre les activités des différents sujets.

En résumé, on peut mettre en évidence, d'une façon constante une activité tréhalasique chez l'Homme et la plupart des Mammifères. Cette activité est localisée dans le rein, l'intestin, le foie et le sang de ceux-ci. L'enzyme sérique, dont le taux varie beaucoup selon les espèces et selon les individus d'une même espèce, provient en grande partie du foie. Une fraction de l'enzyme sérique semble être élaborée par le rein. La seule variation constante du taux de l'enzyme sérique est observée dans les cirrhoses décompensées, où la tréhalasémie est abaissée. L'enzyme hépatique semble être éliminé par la bile, quant à la légère activité tréhalasique retrouvée dans l'urine, elle provient vraisemblablement d'une desquamation cellulaire des tubules rénaux.

PROPRIÉTÉS DES TRÉHALASES RÉNALES DE PORC ET D'HOMME

A) Caractéristiques de la cinétique enzymatique

Le pH optimum de ces tréhalases se situe en milieu faiblement acide, c'est dans cette zone de pH que GEORGET a localisé le pH optimum de la tréhalase sérique. L'activité progresse lentement entre pH 3 et pH 5. A titre comparatif, nous

reproduisons un tableau emprunté à COURTOIS et PERCHERON (22). Dans ce tableau XVIII sont indiqués les pH optimum et les constantes de MICHAELIS de quelques tréhalases purifiées. On voit que le pH optimum des tréhalases rénales est du même ordre de grandeur que celui de tréhalases de diverses origines.

Les valeurs très faibles des constantes de MICHAELIS montrent la grande affinité des tréhalases rénales des Mammifères pour le tréhalose. La valeur de la constante de MICHAELIS du rein de Porc est proche de celle de l'intestin du même animal ; la constante de MICHAELIS de l'enzyme du rein d'Homme est du même ordre de grandeur que celle de l'enzyme du sérum humain ; elle est identique à celle de la tréhalase de l'urine humaine (19).

L'étude de l'influence de la température montre que la tréhalase du rein de Porc est très thermostable puisque l'inactivation n'est vraiment importante que vers 70°. La tréhalase du sérum humain est, elle aussi, assez stable, elle conserve son activité après conservation de plusieurs jours à 37°.

Les tréhalases des Mammifères semblent donc assez thermostables contrairement aux tréhalases de *Pseudomonas* (1) et de Levure (42) qui sont inactivées vers 40°.

T A B L E A U N ° XVIII

pH optimum et constante de MICHAELIS

Km de quelques tréhalases purifiées

Origine de l'enzyme	pH	Km
<u>Pseudomonas fluorescens</u>	6,45	$2,0 \cdot 10^{-2}$
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	5,7	$4,1 \cdot 10^{-4}$
<u>Melolontha vulgaris</u>	6,25	$6,0 \cdot 10^{-4}$
Ver à soie	5,2	$4,4 \cdot 10^{-4}$
<u>Blaberus discoidalis</u> (muscle)	6,0	$1,7 \cdot 10^{-3}$
<u>Blaberus discoidalis</u>	5,0	$5,0 \cdot 10^{-4}$
Rein de Lapin	6,3	$3,5 \cdot 10^{-3}$
Intestin de Porc	6,0	$5,4 \cdot 10^{-3}$
Rein de Porc	5,7	$5,0 \cdot 10^{-3}$
Rein d'Homme	5,7	$3,0 \cdot 10^{-3}$

L'étude de la cinétique enzymatique des tréhalases rénales purifiées montre que leur comportement est comme celui de tréhalases de diverses origines assez différent de celui des autres disaccharidases :

1) Alors que les disaccharidases sont inhibées par les oses libérés du substrat lors de l'hydrolyse, les tréhalases rénales ne sont pas influencées par le glucose ni par l'acide gluconique. Cette absence d'inhibition par le glucose a été retrouvée avec les tréhalases purifiées de levure, d'insecte, et du sérum humain ; les travaux non publiés sur la tréhalase de l'intestin de Porc montrent qu'elle a, sur ce point, le même comportement.

2) Les disaccharidases ont en règle générale, la propriété de transférer l'ose libéré lors de l'hydrolyse sur des accepteurs possédant une fonction alcool et en particulier sur des oses ou des oligosaccharides. Au cours de l'hydrolyse, le tréhalose pourrait servir d'accepteur à des molécules de glucose nouvellement libérées pour former des di ou des trisaccharides nouveaux ; nous n'avons jamais observé ce phénomène de transfert avec les tréhalases rénales au cours de l'hydrolyse ; le seul corps qui apparaît est le glucose et le seul accepteur qui semble possible est l'eau.

Ce comportement a également été observé avec les tréhalases de l'intestin de Porc (26), de levure, de Hanneton (24), de Sauterelle Mélanophus Différencialis (54) et de

Pseudomonas (1). La tréhalase purifiée du Hanneton (38), mise en présence de tréhalose froid et de glucose marqué ne provoque pas l'apparition de tréhalose marqué.

L'absence d'inhibition par le glucose et l'absence d'activité transférente confèrent aux tréhalases rénales un comportement très classique sur le plan de la cinétique enzymatique. Après une zone où la réaction est d'ordre zéro, on obtient une hydrolyse totale du tréhalose à la suite d'une réaction monomoléculaire.

B) Action des effecteurs

Le sodium qui possède la propriété d'activer la sucrase et les maltases intestinales (58) n'a pas eu d'action sur les tréhalases rénales. Les autres ions que nous avons étudiés sont d'ailleurs restés sans effet sur celles-ci.

Parmi les mono, di et oligosaccharides que nous avons étudiés, seul le saccharose a inhibé, et d'une façon importante, les tréhalases rénales. L'érythritol, inhibiteur d'un grand nombre de glucosidases n'a pas eu d'action sur celles-ci. Les trisaccharides qui proviennent du saccharose par addition d'un ose n'ont aucun pouvoir inhibiteur. Il est vraisemblable qu'en augmentant le volume de ces molécules de glucides, on rend impossible la liaison de l'enzyme avec l'inhibiteur. L'inhibition observée avec le saccharose est typiquement compétitive. Le saccharose doit donc se lier à l'enzyme au niveau de son

centre actif. Il est vraisemblable que le volume moléculaire du saccharose, proche de celui du tréhalose est le volume idéal pour obtenir une liaison enzyme-substrat efficace. Lorsque l'on augmente ce volume, la molécule nouvelle devient trop grosse pour s'accoler au site actif de l'enzyme. On retrouve la même inhibition avec la tréhalase de l'intestin de Porc (44) et du sérum humain (19). L'étude de ces tréhalases montre que leur inhibition par le saccharose possède les mêmes caractéristiques que celles obtenues avec les enzymes rénaux. Seules les tréhalases de Pseudomonas et de Hanneton n'ont pas été inhibées par le saccharose qui inhibe par contre celle de deux insectes : Hyalophora-cecropia (40) et Blaberus discoidalis (37).

Le phloridzoside et son aglycone le phlorétol, ont inhibé fortement les tréhalases rénales étudiées. L'inhibition par le phlorétol est du même type que celle obtenue avec le phloridzoside mais elle est beaucoup plus intense. Le phlorétol et son glucoside inhibent compétitivement la tréhalase du rein humain ; mais le comportement de l'enzyme du rein de Porc est différent : le pourcentage d'inhibition ne varie pas quelle que soit la quantité de substrat dans le milieu, elle est donc typiquement non compétitive. Avec les tréhalases du sérum et de l'urine humaine on a pu mettre en évidence, également, une inhibition compétitive de ces enzymes par ces deux corps (19) ; par contre le phlorétol et son glucoside provoquent une inhibition du type mixte de la tréhalase de l'intestin de Porc (44). Un autre dérivé du phlorétol, le méthyl-para-phloridzoside est demeuré sans action sur les tréhalases de Mammifères que nous venons

de citer. Le phloridzozide n'a pas inhibé les tréhalases de Pseudomonas et de Hanneton, mais il inhibe la tréhalase de l'intestin de Rat (58).

Ainsi, toutes les tréhalases des Mammifères étudiés ont été inhibées par le phloridzozide. Cet hétéroside empêche la résorption du glucose par l'intestin et le rein ; comme nous l'avons vu, la tréhalase rénale, est localisée au niveau des tubules rénaux. Il est donc possible que la tréhalase intervienne dans la résorption rénale du glucose par un mécanisme non encore élucidé.

Récemment, SACKTOR a proposé une interprétation identique pour expliquer la présence de tréhalase dans les cellules des tubules rénaux (56). Il a montré en incubant des tranches de rein de Lapin avec du glucose marqué, que cet organe pouvait être le siège d'une biosynthèse de tréhalose. Le mécanisme de cette synthèse n'est pas encore connu dans ses détails mais il se pourrait bien que l'on trouve à ce niveau des relations entre la tréhalase et la réabsorption rénale du glucose.

Parmi les flavanones que nous avons étudiées et dont la structure est très proche du phloridzozide, seul le salipurposide et son aglycone, le naringétole, ont manifesté un fort pouvoir inhibiteur vis-à-vis des tréhalases des Mammifères. L'inhibition des tréhalases rénales par le salipurposide est du même ordre de grandeur que celle du phloridzozide, celle du naringétole du même ordre de grandeur que celle du phlorétole en ce qui concerne le rein de Porc ; car l'enzyme du rein humain n'est pas inhibé par le naringétole. Parmi les corps

dérivant du naringétoï et de structure voisine du salipurposide :
dérivés méthylés, isomères où le β glucose occupe une autre
position, diglucosides et flavanones avec des disaccharides,
aucun n'a inhibé de façon importante les tréhalases rénales. Le
pouvoir inhibiteur est donc une propriété de ces aglycones et
elle diminue lorsque des substituants viennent se greffer sur
celles-ci. L'hydroxyle de la position 4' des chalcones qui
correspond à la position 7' des flavanones semble jouer un rôle
particulier ; il ne doit pas être substitué pour que se manifeste
l'inhibition. Un point très important à signaler est que le sali-
purposide comme le phloridzozide sont capable de provoquer un
abaissement du seuil de résorption rénal du glucose et de
provoquer ainsi une élimination de ce sucre dans l'urine sans
qu'il existe nécessairement une hyperglycémie à un taux patho-
logique.

CONCLUSIONS

0 0 0 0 0 0 0 0 0 0

I - Répartition des tréhalases chez les Mammifères

Nous avons déterminé l'activité tréhalasique des liquides biologiques et des préparations purifiées d'organes par hydrolyse du tréhalose à 37° et au pH optimum de l'enzyme suivie du dosage du glucose libéré.

Chez l'Homme, nous avons retrouvé une activité tréhalasique importante dans le rein et plus faible dans le foie. Tous les autres organes étudiés se sont montrés dépourvus d'activité.

Chez les Mammifères, nous avons recherché l'enzyme chez le Chien, le Chat, le Lapin, le Rat et l'Odontra. Tous ces animaux à l'exception du Rat, possèdent une tréhalase rénale et hépatique ; on note une grande différence d'activité chez les individus d'une même espèce.

Les Rats sauvages et quelques Chats ne possèdent pas d'activité tréhalasique dans leur sérum contrairement aux autres animaux étudiés.

La tréhalase sérique de l'Homme augmente depuis la naissance où elle existe à un taux très faible, pour atteindre le taux de l'adulte entre 6 et 11 ans. Nous avons montré que, chez un diabétique hypertréhalasémique qui possède un taux très élevé de l'enzyme sérique, depuis plusieurs années, la tréhalase

ne semblait pas provenir du passage de l'enzyme de l'intestin à travers la barrière intestinale.

Nous avons ensuite montré que la totalité de l'enzyme sérique ne pouvait pas être d'origine rénale ; en effet, des sujets binéphrectomisés conservent après plusieurs mois, une activité tréhalasique sérique importante. Par contre, une origine hépatique d'une partie de l'enzyme est vraisemblable ; en effet chez les sujets cirrhotiques présentant des fonctions hépatiques très perturbées, nous avons noté, très régulièrement, un abaissement de la tréhalasémie.

Le foie semble déverser une grande partie de la tréhalase dans l'intestin par l'intermédiaire de la bile. Nous avons retrouvé une nette activité tréhalasique dans les biles étudiées. D'autre part, les sujets présentant un syndrome de cholestase par obstruction des voies biliaires principales sont hypertréhalasémiques.

Le phloridzoside β glucoside d'une dihydrochalcone inhibe fortement la tréhalase sérique. Cet hétéroside, injecté à un animal provoque une fuite rénale de glucose ; il est possible que cette diminution de réabsorption du glucose coïncide avec une inhibition de la tréhalase rénale. Une injection de phloridzoside pratiquée à un cobaye dont le rein est riche en tréhalase et à un rat dont le rein ne contient pas cet enzyme, provoque chez ces deux animaux une fuite urinaire de glucose.

II - Tréhalase rénale du Porc et de l'Homme

La tréhalase rénale est extraite de la zone corticale par plusieurs congélations, décongélations successives. On procède à une première purification par précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium. La fraction recueillie entre 50 et 75 % de saturation en sulfate d'ammonium est soumise à deux électrophorèses successives en élution continue sur un appareil Beckman-Spinco modèle C P.

L'activité spécifique des préparations augmente d'environ 100 fois après cette purification. L'électrophorèse sur cello-gel de la préparation concentrée n'a permis de déceler qu'une seule bande de protéines. L'activité spécifique des deux reins humains que nous avons obtenue est environ 10 fois inférieure à celle des reins de Porc.

Les préparations obtenues ne possèdent pas d'autres enzymes associés. Elles n'hydrolysent que le tréhalose ; deux dérivés non symétriques du tréhalose, l' α galactosido-6-tréhalose et l'anhydro-3-6-tréhalose n'ont pas été scindés.

a) - Tréhalase du rein de Porc

Le pH optimum de l'enzyme du rein de Porc est de 5,7 ; l'hydrolyse du tréhalose par celui-ci s'effectue selon une réaction du premier ordre ; la détermination de la constante de

WILHELMY montre que le glucose libéré n'exerce pas d'inhibition et que la réaction d'hydrolyse du tréhalose ne s'accompagne pas de transfert.

La vitesse maximum est de 84 micromoles par minute et la constante de MICHAELIS déterminée à pH 5,7 et à 37° est de $5 \cdot 10^{-3}$. La représentation de nos résultats selon la méthode d'HOFSTEE indique que notre préparation ne contient qu'un enzyme hydrolysant le tréhalose.

La tréhalase du Porc est très thermostable puisqu'elle conserve toute son activité à 65°C et ne s'inactive que vers 70°C.

b) - Tréhalase du rein d'Homme

Elle possède les mêmes caractéristiques que l'enzyme de Porc. Son pH optimum se situe vers 5,7 - 5,8, la vitesse maximum de réaction oscille entre 37 et 40 micromoles de tréhalose par minute et sa constante de MICHAELIS déterminée au pH optimum et à 37° est de $3 \cdot 10^{-3}$.

ACTION DE DIFFERENTS EFFECTEURS

a) - Les ions

Les cations Potassium, Calcium, Magnésium, Zinc,

Nickel et Cobalt d'une part, ainsi que les an ions Chlorures, Sulfates et Nitrates sont restés sans effet sur les tréhalases rénales étudiées.

Il en est de même du Sodium qui a la propriété d'activer la sucrase et la maltase intestinale, l'acide para-chloromercuri-benzoïque est demeuré lui aussi sans effet.

b) - Oses et oligosaccharides

Nous n'avons observé aucune activation ou inhibition avec le D-glucose, le D-glucitol, le D-gluconate de potassium, le raffinose et le mélézitose.

Le saccharose par contre, a fortement inhibé les tréhalases rénales de l'Homme et du Porc. Cette inhibition est dans les deux cas, typiquement compétitive. Le calcul de la constante de dissociation du composé enzyme-inhibiteur est égale à $10,8 \cdot 10^{-3}$ pour le rein de Porc et à $6 \cdot 10^{-3}$ pour le rein d'Homme.

c) - Hétérosides

Parmi les dérivés des dihydrochalcones, le phlorid-zoside et son aglycone, le phlorétol ont fortement inhibé les tréhalases du rein de Porc et d'Homme. L'inhibition de l'enzyme du rein de Porc est pour ces deux corps non compétitive ;

le phlorétol provoque une inhibition beaucoup plus importante que son glucoside ; le calcul du K I donne $10 \cdot 10^{-3}$ pour le phloridzozide et $0,2 \cdot 10^{-3}$ pour le phlorétol.

L'inhibition du rein d'Homme par ces deux corps est typiquement compétitive ; elle est beaucoup plus importante, ici aussi avec l'aglycone qu'avec le glucoside. Le K I pour le phloridzozide est de $4 \cdot 10^{-3}$ alors qu'il est de $0,1 \cdot 10^{-3}$ pour le phlorétol.

Parmi les dérivés de flavanones étudiés dont la structure est proche de celle des dihydrochalcones, seul le salipurposide, glucoside du naringétol a inhibé les tréhalases rénales ; cette inhibition est du même ordre de grandeur que celle obtenue avec le phloridzozide. Le naringétol inhibe l'enzyme du rein de Porc et demeure sans effet sur celui du rein d'Homme. Cette inhibition est du type "incompétitif". Le naringoside, où le naringétol est osidifié par le néohespéridose α L-rhamnosido-1-2-glucose, n'a provoqué, ainsi que les autres flavanones étudiés, aucune inhibition des tréhalases rénales.

Parmi les autres hétérosides étudiés, deux β glucosides ont été inhibiteurs ; le picéoside, β glucoside de la paraoxyacétophénone et le phényl β glucoside ont en effet provoqué une légère inhibition des enzymes rénaux. L'acétophénone et l'acétone sont par contre restés sans effet sur les tréhalases rénales de l'Homme et du Porc.

B I B L I O G R A P H I E

-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-

1. ARCILLA, M.A., GUILLOUX, E. et COUPELOIS, J.M. -
C. R. Ac. Sc., 1963, ⁶227, 1779.
2. AUGUSTINSEN, K.B. -
Acta. Physiol. Scand., 1948, 15 e suppl., 52.
3. AURICCHIO, S. -
Enzymol. Biol. et Clin., 1963, 3, 193.
4. AURICCHIO, S., RUBINO, A. et MURSET, G. -
Pédiatries, 1965, 35, 944.
5. AURICCHIO, S., RUBINO, A., TOSI, R., SEMENZA, G., LANDOLT, M.,
KISTLER, H.J. et PRADER, A. -
Enzym. Biol. Clin., 1963, 3, 193.
6. AURICCHIO, S., SEMENZA, G. et RUBINO, A. -
Biochim. Biophys. Acta., 1965, 96, 498.
7. BERTHELOT, M. -
Ann. Chim. et Phys., 1859, 53, 269.
8. BIRCH, G.G. -
Adv. Carbohydr. Chem., 1963, 18, 201-225.

9. BOURQUELOT, E. -
C. R. Acad. Sci., 1889, 108, 568.
C. R. Acad. Sci., 1890, 111, 534.
C. R. Acad. Sci., 1891, 113, 749.
Bull. Soc. Mycol. France, 1889 à 1893, 5 à 9, 19.
10. BOURQUELOT, E. -
Bull. Soc. Mycol. France, 1893, 9, 189.
11. BOURQUELOT, E. et GLEY, E. -
C. R. Soc. Biol., 1895, 10 (2), 555.
12. BOWMAN, I.B.R., BRAND, T. et VON TOBIE, E. -
J. Exptl. Parasitol., 1960, 10, 274.
13. CABIB, E. et LELLOIR, L.F. -
J. Biol. Chem., 1958, 231, 259.
14. COURTOIS, J.E. -
Les Disaccharidases, in Problèmes actuels de Biochimie Appliquée par M.L. GIRARD.
Masson Edit. Paris 1968, 2, 107-151.
15. COURTOIS, J.E., CHERON, J.M. et DEMELLIER, J.F. -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1966, 48, 1279.
16. COURTOIS, J.E., DEBRIS, M.M. et GEORGET, J.Cl. -
Bull. Acad. Nat. Méd., 1962, 146, 599.

17. COURTOIS, J.E., DEBRIS, M.M. et GEORGET, J.Cl. -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 568.
18. COURTOIS, J.E. et DEMELIER, J.F. -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1966, 48, 277.
19. COURTOIS, J.E., DEMELIER, J.F., LABAT, J. et BARK, S. -
C. R. Soc. Biol., 1969, à l'impression.
20. COURTOIS, J.E., DEMELIER, J.F. et MASSARI, M.-
C. R. Soc. Biol., 1969, à l'impression.
21. COURTOIS, J.E., GEORGET, J.Cl. et DEMELIER, J.F. -
C. R. Soc. Biol., 1966, 160, 534.
22. COURTOIS, J.E. et PERCHERON, F. -
Récentes acquisitions sur le tréhalose et la tréhalase.
Angew. Chem., à l'impression
23. COURTOIS, J.E., PERCHERON, F. et GUILLOUX, E. -
C. R. Ac. Sc., 1967, 265, 2111.
24. COURTOIS, J.E., PETEK, F. et KOLAH-ZANOUI, M.A. -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 735.
25. COURTOIS, J.E. et POISSON, J. -
Sem. Hôp. Pathol. et Biol., 1960, 8, 825.
26. DAHLQVIST, A. -
Acta Chem. Scand., 1960, 14, 9.

27. DAHLQVIST, A. -
Biochem. J., 1961, 78, 282.
28. DAHLQVIST, A. -
Anal. Biochem., 1964, 7, 18.
29. DAHLQVIST, A. -
WEST-EUROPEAN Symposia on Clinical Chemistry,
1965, 4, 136.
30. DAHLQVIST, A. -
Intestinal disaccharidases and disaccharide intolerance.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1967, 49, 1635-1646.
31. DAHLQVIST, A. et BRUN, A. -
J. Histochem. Cytochem., 1962, 10, 294.
32. DEBRIS, M.M., COURTOIS, J.E. et PETEK, F. -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 291.
33. DEER, R.F. et RANDALL, D.D. -
J. Insect. Physiol., 1966, 12, 1105.
34. FISCHER, E. et NIEBEL, W. -
Chem. Centr., 1896, 1, 499.
35. FREREJACQUE, M. -
C. R. Acad. Sc., 1941, 213, 88.
36. GEORGET, J.Cl. -
Th. Doct. Univ. Pharm., Paris, 1967.

37. GILBY, A.R., WYATT, S.S. et WYATT, G.R. -
Acta Biochim. Pol., 1967, 14, 83.
38. GUILLOUX, E., COURTOIS, J.E. et PERCHERON, F. -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 1915.
39. GUILLOUX, E. et PERCHERON, F. -
C. R. Ac. Sc., 1968, série C, 266, 153.
40. GUSSEN, A.E. et WYATT, G.R. -
Arch. Biochem. Biophys., 1965, 112, 626.
41. HOFSTEE, B.H.J. -
Science, 1952, 116, 329.
42. KRUGER, J. et HESS, B. -
Archiv. F. Mikrobiol., 1968, 61, 154.
43. KUNITZ, M. -
J. Gen. Physiol., 1952, 35, 423.
44. LABAT, J., DEMELIER, J.F. et COURTOIS, J.E. -
Proceed. VIe F.E.B.S. Meeting. Madrid 1969.
45. LINEWEAVER, H. et BURK, D.J. -
Am. Chem. Soc., 1934, 56, 658.
46. LUKOMSKAJA, I.S. -
Biokhimiya, 1962, 27, 875.

47. LUKOMSKAJA, I.S., et TARASOVA, G.I. -
Biokhimiya, 1965, 30, 95.
48. LUNEAU, R. -
Th. Doct. Univ. Pharm. Paris, 1938.
49. MYRBACK, K. -
Ergebn. Enzym.forsch., 1949, 10, 168.
50. PERCHERON, F. et GUILLOUX, E. -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 543.
51. PETEK, F., VILLARROYA, E. et COURTOIS, J.E. -
European J. Biochem., 1969, 8, 395.
52. PRICE, R.G. et DANCE, N. -
Biochem. J., 1967, 105, 877.
53. RABATE, J. -
Th. Doct. Sc. Paris, 1934.
54. ROBINSON, D., PRICE, R.G. et DANCE, N. -
Biochem. J., 1967, 102, 525.
55. SACKTOR, B. -
Proceed. Nat. Acad. Sc. Us., 1968, 60, 1007.
56. SACKTOR, B. et BERGER, S.J. -
Biochem. and Biophys. Research Communication,
1969, 6, 796.

57. SADEGH MOGHADAM -
Th. Doct. Univ. Pharm. Paris, 1930.
58. SEMENZA, G. et RIHOVA, L. -
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 178, 393.
59. SEMENZA, G., TOSI, R. et DELACHAUX, M.C. -
Helv. Chim. Acta, 1963, 46, 1765.
60. VAN HANDEL, E. -
Science, 1969, 123, 1075.
61. WIGGERS, H.A.L. -
Ann. Chem., 1832, 1, 129.
62. WYATT, G.R. et KALF, G.F. -
Fed. Proc., 1956, 15, 388.
63. WYATT, G.R. et KALF, G.F. -
J. Gen. Physiol., 1957, 40, 833.

T A B L E D E S M A T I E R E S

-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-

	<u>Pages</u>
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>PREMIERE PARTIE - TREHALASE DES MAMMIFERES</u>	8
<u>CHAPITRE I - MATERIEL ET METHODE</u>	8
Détermination de l'activité tréha- lasique du sérum	8
Détermination de l'activité enzyma- tique des tissus	9
<u>CHAPITRE II - REPARTITION DE LA TREHALASE</u>	10
Localisation chez l'Homme	10
Localisation chez quelques Mammifères	11
<u>CHAPITRE III - TREHALASE SERIQUE DE L'HOMME</u>	14
Adultes normaux et enfants	14
Variation du taux dans diverses affections	15
Elimination de la tréhalase	24
Action inhibitrice du phloridzosite .	26
<u>DEUXIEME PARTIE - TREHALASES RENALES DU PORC ET DE L'HOMME</u> ...	31
<u>CHAPITRE I - MATERIEL ET METHODES</u>	31
<u>CHAPITRE II - SEPARATION DE L'ENZYME</u>	33.

	<u>Pages</u>
<u>CHAPITRE III</u> - PURIFICATION DE L'ENZYME	36
Précipitation par le sulfate d'ammonium	36
Electrophorèse en élution continue ..	38
Recherche des activités enzymatiques associées et spécificité d'action ...	41
<u>CHAPITRE IV</u> - ETUDE DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE DES TREHALASES RENALES	43
A) <u>REIN DE PORC</u>	43
Détermination du pH optimum	43
Hydrolyse du substrat en fonction du temps	45
Détermination de la vitesse maximum .	48
Hydrolyse du substrat en fonction de la quantité d'enzyme	50
Détermination de la constante de MICHAELIS	52
Thermostabilité de l'enzyme	56
B) <u>REIN D'HOMME</u>	58
pH optimum	58
Vitesse maximum et constante de MICHAELIS	60
<u>CHAPITRE V</u> - ACTION DE DIFFERENTS EFFECTEURS	63
Action de divers ions :	63
Action de divers oses et oligosaccha- rides	65
Action de différents hétérosides	67

<u>CHAPITRE VI - ETUDE DE L'INHIBITION DE LA TRÉHALASE</u> <u>DU REIN D'HOMME ET DE PORC PAR LE</u> <u>SACCHAROSE, LE PHLORIDZOSIDE ET LE</u> <u>PHLORETOL</u>	77
I - <u>Tréhalase du rein de Porc</u>	78
Inhibition par le saccharose	78
Inhibition par le Phloridzосide	81
Inhibition par le phlorétol et le naringétol	81
II - <u>Tréhalase du rein d'Homme</u>	83
Inhibition par le saccharose	83
Inhibition par le phloridzосide	83
Inhibition par le phlorétol	83
<u>DISCUSSION GENERALE</u>	86
<u>CONCLUSION</u>	97
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	103
<u>TABLE DES MATIERES</u>	110

